

Minna Äikäs

Koko genomin monistamiseen tarkoitettujen kittien soveltuvuus alkiodiagnostiikkaan

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Koulutusohjelma

Opinnäytetyö

23.4.2014

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Minna Äikäs Koko genomin monistamiseen tarkoitettujen kittien soveltuvuus alkiodiagnostiikkaan 61 sivua + 3 liitettä 23.4.2014
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytikko AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Sairaalageneetikko Tiina Alitalo Lehtori Hannele Pihlaja
<p>Ennen kuin alkio siirretään kohtuun IVF (in vitro fertilization) -hoidossa, voidaan alkiodiagnostiikkaa tehdä niissä perheissä, joissa sikiöllä on riski saada vakava perinnöllinen sairaus tai periä balansoitu translokaatio ei-balansoidussa muodossa. Ennen tutkimusta tiedossa on oltava toisen tai molempien vanhempien kantama geenimutaatio/lokuksen alleelikoot tai rakenteellinen kromosomimuutos. Alkiodiagnostiikassa saadaan tutkittavaksi yleensä yksi tai kaksi blastomeerisolua. Tällä hetkellä alkiodiagnostiikassa käytetään FISH- tai PCR-menetelmiin perustuvia tutkimusmenetelmiä. Koko genomin monistaminen mahdollistaisi tulevaisuudessa uusien tutkimusmenetelmien, esimerkiksi array-CGH (molekyylikaryotyypitys) tai NGS (next generation sequencing) -menetelmän käyttöönoton. NGS-menetelmän avulla saadaan tietoa niin kromosomien rakenteellisista, määrällisistä kuin geenipoikkeavuuksista.</p> <p>Opinnäytetyössä testattiin kahteen eri menetelmään perustuvia koko genomin monistamiseen tarkoitettuja kittejä. Lähdemateriaalina käytettiin alkion solujen lisäksi istukka-, iho- ja lapsivesinäytteistä saatuja soluja. Testattavina olivat Repli-g valmistajalta MDA (multiple displacement amplification) -tekniikkaan perustuvat Midi ja Single Cell -kitit, sekä New England Biolabs/Rubicon Genomics valmistajan PCR-monistamiseen perustuva Single Cell -kitti. Opinnäytetyössä haluttiin selvittää, voidaanko tutkimukseen valituilla kiteillä suorittaa koko genomin monistaminen onnistuneesti niin, että monistuksen tuloksena saadaan riittävästi ja riittävän puhdasta DNA:ta jatkotutkimuksiin, ja onko kittien suorituskyyvyssä eroa esimerkiksi monistettavan DNA:n määrän, puhtauden tai fragmenttikoon suhteen.</p> <p>Koko genomin monistamiseen tarkoitetuilla kiteillä onnistuttiin monistamaan sekä alkoiden että viljeltyjen kudosten DNA:ta kittien valmistajan lupaamien odotusarvojen suuntaisesti. Saavutettu DNA-määrä ja puhtausaste ovat riittäviä jatkotutkimuksiin. Ennakkoon tiedettiin, että koko genomin monistaminen muutamista soluista on erityisen altis kontaminaatiolle. Koko genomin monistamista ei tässäkään lyhytaikaisessa tutkimuksessa pystytty suorittamaan täysin ilman kontaminaatiota. Huolimatta mahdollisesta kontaminaatiosta, voidaan tulosten perusteella vetää johtopäätöksiä kittien eroista sekä monistuskyyvystä. MDA-tekniikkaa käyttävä koko genomin monistaminen tuottaa suurempikokoista monistustuotetta kuin PCR-pohjainen monistaminen. Suuremman fragmenttikoon lisäksi se tuottaa sekä pitoisuudeltaan että puhtausasteeltaan parempaa monistustuotetta kuin PCR-menetelmällä monistettu DNA. Tulosten perusteella voidaan suositella, että jatkossa kannattaa käyttää Repli-g -kittejä solujen DNA:n monistamiseen niin array-CGH kuin NGS-tutkimuksia varten.</p>	
Avainsanat	koko genomin monistaminen, WGA, alkiodiagnostiikka, molekyylikaryotyypitys, MK, NGS

Author Title Number of Pages Date	Minna Äikäs Suitability of Whole Genome Amplification Kits in Pre-Implantation Genetic Diagnosis 61 pages + 3 appendices 23 April 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Tiina Alitalo, Medical Geneticist, Associate Professor Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>Before embryo is transferred into the uterus in IVF (in vitro fertilization), pre-implantation genetic diagnosis (PGD) can be offered to families whose foetus has a risk of inheriting a serious genetic disease or a translocation in non-balanced form. Before PGD analysis, the gene mutation, allele sizes of the loci, or structural chromosome abnormality of the parents has to be known. PGD analysis is usually performed using one or two blastomeres. For a long time, the most commonly used PGD methods were FISH (fluorescent in situ hybridization) and PCR (polymerase chain reaction). Whole genome amplification (WGA) enables the introduction of new research methods, such as array CGH and NGS (next generation sequencing), to PGD. With the help of NGS, information of genetic mutations and structural and quantitative abnormalities of chromosomes can be obtained simultaneously.</p> <p>In this Thesis, blastomeres, cells from placenta, skin and amniotic fluid were used as research material for three WGA kits. Midi and Single Cell kits (Qiagen, Repli-g) were based on the MDA (Multiple displacement of application) technique, and a Single Cell Kit (New England Biolabs/Rubicon Genomics) on PCR amplification. The aim of this Thesis was to examine whether the kits chosen can give enough and sufficiently pure DNA for further studies (aCGH and NGS), and whether the kits have significant differences in their performance concerning for example the amount, purity and fragment size of amplified DNA.</p> <p>By using the WGA kits, DNA was successfully amplified from blastomeres as well as from the cultured tissue cells in accordance with the expectation values from the manufacturer. Both the amount of the DNA as well as the level of purity was sufficient for follow-up research. It was already known from the literature, that amplifying a whole genome from only few cells was especially vulnerable for contamination. Also in this short-term research, the amplification of a whole genome could not be performed without contamination. In spite of the contamination, tentative conclusions about the differences of the kits and their amplifying abilities could be drawn. The whole genome amplification, which is based on MDA technique, generates larger DNA fragments than the technique based on PCR amplification. In addition to the larger fragment size, MDA based WGA kits give higher amount of DNA and higher purity level than the PCR based kit. Based on these results, it can be concluded that the MDA based kit is better suited for both array CGH and NGS studies.</p>	
Keywords	whole genome amplification, WGA, pre-implantation genetic diagnosis, PGD, array CGH, NGS

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Alkiodiagnostiikka	2
2.1	Ihmisen perintötekijät ja geenisäätely	4
2.2	Tutkimusmenetelmät alkiodiagnostiikassa	6
2.2.1	FISH – Fluoresenssi in situ -hybridisaatio menetelmä	7
2.2.2	PCR – Polymeraasiketjureatio	8
2.2.3	Array-CGH	10
2.2.4	NGS – Next Generation Sequencing	11
3	Koko genomin monistaminen (WGA) alkiodiagnostiikassa	13
3.1	PCR-tekniikkaan perustuva WGA	15
3.2	MDA-tekniikkaan perustuva WGA	16
3.3	Monistetun DNA:n laadun arviointi	17
3.3.1	DNA:n konsentraation ja puhtausasteen mittaaminen	18
3.3.2	DNA:n analysointi agarosigeelielektroforeesilla	18
3.3.3	NanoDrop ja Qubit® -mittauslaitteet	19
3.3.4	Monistustuotteen puhdistaminen	20
4	Steriili työskentely WGA:n ja soluviljelyn yhteydessä	21
4.1	Aseptinen työskentely	21
4.2	Kontaminaatoriski	23
4.3	Solujen viljeleminen	24
5	Opinnäytetyön tavoite ja tutkimuskysymykset	26
6	Opinnäytetyön suorittaminen	27
6.1	Käytetyt näytteet	28
6.2	Käytetyt kitit ja kittien vertailu	28
6.3	Laboratoriotyövaiheet	32
6.3.1	Laboratoriotyövaihe 1 – viljeltyt solut	33
6.3.2	Laboratoriotyövaihe 2 – alkiot	36
7	Tulokset	38
7.1	Laboratoriotyövaihe 1 – viljeltyt solut	39
7.2	Laboratoriotyövaihe 2 – alkiot	43

7.3	Tulosten vertailu eri mittalaitteilla	48
8	Pohdinta	49
8.1	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset	49
8.2	Luotettavuus ja eettisyys	52
8.3	Ehdotuksia jatkotutkimukseksi	54
	Lähteet	55
	Liitteet	
	Liite 1. Koko genomin monistamisen tulokset – viljeltyt solut	
	Liite 2. Koko genomin monistamisen tulokset – alkiot	
	Liite 3. Kopion digilupa, kuvio 1	

1 Johdanto

Ultraäänitutkimus ja istukka- tai lapsivesinäytteen kromosomi- ja geenitutkimukset ovat keinoja selvittää tulevan lapsen mahdollinen sairaus raskauden aikana. Aborttilain mukaan raskaus voidaan keskeyttää, jos sikiöllä todetaan vakava sairaus. Diagnostiikkaa voidaan tehdä myös jo ennen raskautta. Esimerkiksi tilanteissa, joissa sikiöllä on riski saada vakava perinnöllinen sairaus tai periä balansoitu translokaatio ei-balansoidussa muodossa, on mahdollista käyttää apuna alkiodiagnostiikkaa. Alkiodiagnostiikan avulla voidaan selvittää alkion kantama perinnöllinen sairaus tai kromosomipoikkeavuus jo ennen alkion siirtämistä kohtuun. (Alitalo 2013b; Lehtonen 2006: 49.) Suomessa alkiodiagnostiikkaa on tehty HUSin Genetiikan laboratorion ja IVF (In vitro fertilization, koeputkihedelmöitys) -yksikön yhteistyönä 2000-luvulta lähtien käyttäen niin DNA kuin FISH (Fluoresenssi in situ hybridisaatio) -menetelmiä (Alitalo 2009). Tutkittavia poikkeavuuksia voivat olla esimerkiksi Robertsonin translokaatio, resiprokaalinen translokaatio, sukupuolikromosomissa periytyvä vakava sairaus tai trisomiat (Alitalo – Hyden-Granskog – Piippo – Salonen – Sirkkanen – von Koskull 2007).

Opinnäytetyön aihe on osa HUSLABin (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriopalveluita tarjoava liikelaitos) genetiikan laboratorion alkiodiagnostiikan menetelmien kehittämisprojektia. Meilahden Naistenklinikalla sijaitseva genetiikan laboratorio tutkii perimän poikkeavuuksia sekä kromosomitasolla (sytogenetiikka), että tarkemmalta nukleotiditasolla (molekyyl- ja sytomolekyyligenetiikka). Laboratoriossa tehdään diagnostiikkaa sekä synnynnäisiin, että hankittuihin muutoksiin, eli syöpään liittyen. Opinnäytetyö liittyy laboratorion synnynnäisiin tutkimuksiin ja on toteutettu osittain yhteistyössä Naistenklinikan IVF-yksikön kanssa.

Genetiikan laboratorion tavoitteena on kehittää alkiodiagnostiikkaa korvaamalla FISH-tutkimukset joko Array-CGH (molekyylirikaryotyyppitys, vertaileva genomisen hybridisaatio, Comparative Genomic Hybridization) ja/tai NGS (Next Generation Sequencing) -menetelmällä. FISH-tutkimuksessa voidaan 8-soluvaiheisesta alkioista otetusta blastomeerisolusta tutkia ennalta tiedetty poikkeavuus spesifisten koettimien avulla. Ennen tutkimusta täytyy löytää sopivat koettimet, joilla voidaan selvittää kantaako alkio poikkeavuutta. Koettimien toiminta varmistetaan tekemällä FISH-tutkimus vanhempien näytteille. Array-CGH- tai NGS-menetelmät mahdollistavat koko genomisen tutkimisen laajemmin. Tällä hetkellä laboratoriossa käytetään molekyylirikaryotyyppitystä (MK) selvi-

tettäessä kromosomiston poikkeavuuksia esimerkiksi veren lymfosyyteistä tai istukka- ja lapsivesinäytteistä eristetyistä DNA:sta. Alkiodiagnostiikassa ei array-CGH-menetelmää ole kuitenkaan vielä käytetty. NGS taas on uuden sukupolven sekvensointimenetelmä, joka mahdollistaa koko perimän sekvensoinnin. Menetelmä ja laitteet ovat tällä hetkellä jo käytössä genetiikan laboratoriossa. Menetelmä tulee todennäköisesti olemaan tulevaisuudessa suuressa roolissa laboratorion toiminnassa.

Alkiodiagnostiikan yhteydessä saatava näytemateriaali on hyvin pieni, tutkittavaksi saadaan alkioista yleensä vain yksi tai kaksi solua. Alkiodiagnostiikkaa tehdään genetiikan laboratoriossa alkion blastomeerivaiheisesta solusta. Kolmen päivän ikäisestä alkioista, jossa on noin 6–8 solua, poistetaan IVF-laboratoriossa yksi solu tutkimuksia varten. Vuoden 2014 aikana on tarkoitus siirtyä tutkimaan viiden päivän ikäisiä blastokystivaiheisia alkioita. Alkiossa on blastokystivaiheessa noin 100–120 solua, joten tutkittavaksi voidaan ottaa 5–10 solua. (Alitalo 2013a.)

Array-CGH- ja NGS-menetelmien käyttö vaatii näytemateriaalin DNA:n monistamista ennen tutkimuksen suorittamista. Tähän liittyen opinnäytetyössä testattiin muutamia olemassa olevia kaupallisia monistusreagenssipakkauksia, joilla menetelmään tarvittava koko genomin monistaminen voidaan tehdä. Jatkotutkimukset edellä mainituilla menetelmillä edellyttävät, että monistuksen tuloksena saadaan riittävästi ja riittävän puhdasta DNA:ta.

Reagenssipakkaus-sanalla näkee yleisesti käytettävän sanaa kitti. Suominen ym. (2010: 107) ovat määritelleet sanan kitti seuraavasti: ”Kitti on kaupallinen reagenssi- ja/tai välinesarja, jolla voidaan tehdä jokin tietty laboratoriomenetelmä tai analyysi kätevästi yhden valmistajan tuotteita käyttämällä”. Opinnäytetyön yhteydessä käytetään sanan reagenssipakkaus tilalla sanaa kitti, joka on tunnettu ja yleisesti käytössä laboratorioissa.

2 Alkiodiagnostiikka

Alkiodiagnostiikka, eli preimplantaatiodiagnostiikka (Preimplantation genetic diagnosis, PGD) on kehittynyt vaihtoehto sikiötutkimuksille. Sitä voidaan käyttää geneettisen diagnoosin tekemiseen varhaisalkiosta sekä kromosomipoikkeavuuksien seulonnassa

koeputkihedelmöityksen (In vitro fertilization, IVF) yhteydessä. (Aittomäki – Hovatta 2006: 215.)

Yksittäiset geenivirheet tai kromosomien rakenteelliset tai määrälliset muutokset voivat aiheuttaa syntyvälle lapselle vakavia perinnöllisiä sairauksia. Alkiodiagnostiikan yhteydessä voidaan tutkia näitä tiedossa olevia perheen poikkeavuuksia siirrettävästä alkios- ta, jos tiedossa on molempien tai toisen vanhemman kantama geenimuutos, joka aihe- uttaa perinnöllisen sairauden. Menetelmä edellyttää tutkimukseen tulevalta pariskun- nalta onnistunutta koeputkihedelmöitystä (IVF) ja alkion kehittymistä ennen PGD:tä ja alkion siirtoa kohtuun. (Lähdetie – Horell-Kuitunen 2001: 2257; PGD eli alkiodiagnos- tiikka 2013.)

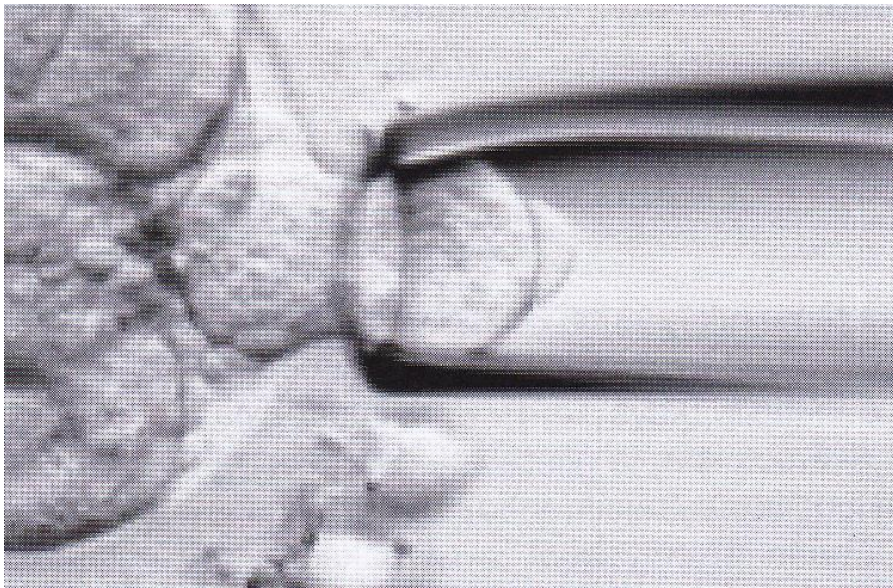
Alkiodiagnostiikkaa on sovellettu lukuisien sairauksien diagnostiikkaan. Syy alkiodiag- nostiikkaan voi olla kromosomien rakenteelliset poikkeavuudet tai X-kromosomaaliset sairaudet (esimerkkeinä balansoidut kromosomipoikkeavuudet eli resiprokaaliset tai Robertsonin translokaatiot vanhemmalla, Klinefelterin oireyhtymä, Fragiili X- oireyhtymä, Duchennen ja Beckerin lihasdystrofia tai hemofiliat). Alkiodiagnostiikan avulla voidaan tutkia myös esimerkiksi yksittäisen autosomaalisen tai X- kromosomaalisen geenivirheen aiheuttamia sairauksia (esimerkkeinä FRAXA, kystinen fibroosi, talassemia, myotoninen dystrofia tai Huntingtonin tauti). (Aittomäki – Hovatta 2006: 215–217; Alitalo 2014c).

Jos pariskunnasta toinen kantaa balansoitua translokaatiota, voi hedelmöittynyt alkio periä translokaation ei-balansoituneessa muodossa. Tällöin raskaus voi keskeytyä tai syntyvä lapsi voi olla vakavasti sairas. Alkiodiagnostiikan avulla tämä voidaan estää valitsemalla kohtuun siirrettäväksi alkio, jolla on translokaatiokromosomien suhteen normaali määrä DNA-materiaalia. Yleensä perheelle suositellaan alkiodiagnostiikan lisäksi myös lisätutkimuksia, kuten sikiötutkimuksia PGD-analyysitulosten varmistami- seksi. (Aittomäki – Hovatta 2006: 215; Alitalo 2014c).

Alkiodiagnostiikka on vaativaa ja huolellista valmistelua edellyttävää diagnostiikkaa ja vaatii tutkimukseen tulevalta pariskunnalta aina koeputki eli IVF tai mikroinjektio eli ICSI -hoitoa. Aina ei voida kuitenkaan taata raskauden alkamista tai alkion siirtoa hoi- doista ja alkiodiagnostiikasta huolimatta, joten alkiodiagnostiikka vaihtoehtona vaatii aina perinpohjaista pohdintaa osallisilta ennen hoidon aloittamista. Pariskunta käy läpi hedelmällisyyden peruskartoituksen ja perinnöllisyysneuvonnan, jonka jälkeen suunni-

tellaan alkiodiagnostiikan aikataulutus, hormonihoidon aloitus sekä koko prosessin kulku. (Aittomäki – Hovatta 2006: 215–217; Alitalo 2014c).

Hormonihoidolla kypsytetään riittävästi munasoluja, jotka punktoidaan munarakkuloista emättimen kautta ultraääniohjauksen avulla. Munasolut hedelmöitetään ja niitä viljellään viljelymaljalla yleensä noin kolme vuorokautta, jolloin alkiot ovat 6–8 soluisia. Näistä voidaan poistaa näytteeksi objektilasille imun avulla 1–2 solua eli blastomeeriä (kuvio 1.). Myös blastokystivaiheisesta alkioista, jolloin alkio 5–6 päivän ikäinen (soluja 100–120, joista siirrettäväksi riittää 5–10) on tehty siirtoja, mutta tällä hetkellä tutkimukset tehdään pääsääntöisesti blastomeereistä. Tulevaisuudessa tutkimukset pyritään tekemään pääasiassa blastokysti-vaiheen soluista. Alkiodiagnostiikka vaatii tarkkaa työtä sekä nopeaa aikataulua diagnostiikkaa tekevältä laboratoriolta. Tutkimustuloksen tulee valmistua yleensä 24 tunnin sisällä, jotta kohtuun siirrettävä alkio on oikeassa kehitysvaiheessa. Loput normaalin tuloksen saaneista alkioista pakastetaan mahdollisten tulevien siirtojen varalle. (Aittomäki – Hovatta 2006: 215; Alitalo 2013a; Lähdetie – Horell-Kuitunen 2001: 2259–2260).



Kuvio 1. Alkiobiopsia (Aittomäki – Hovatta. 2006: 216).

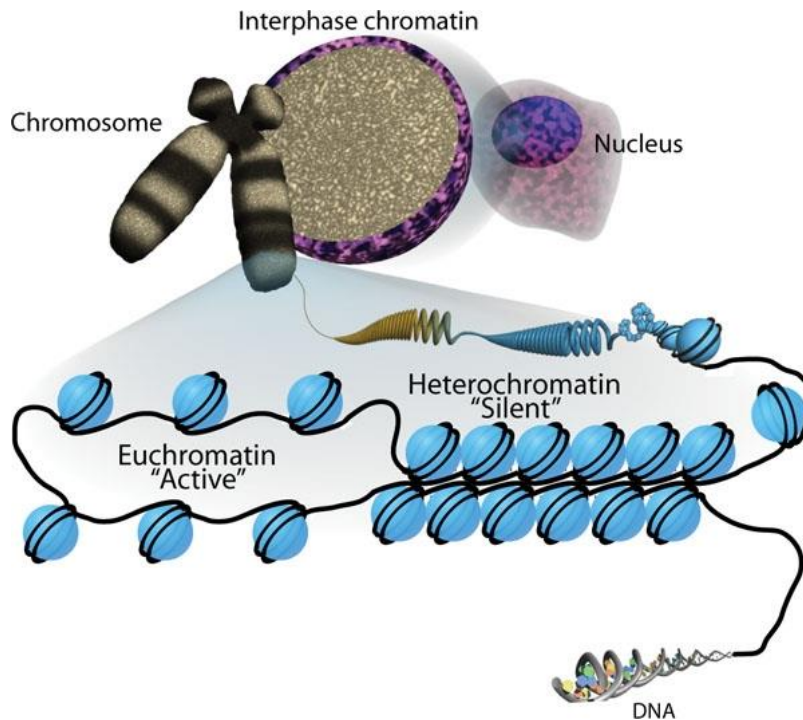
2.1 Ihmisen perintötekijät ja geenisäätely

Ihmisen kehittyminen hedelmöittyneestä munasolusta aikuiseksi yksilöksi tapahtuu ennalta määrätysti ihmisen genomien saneleman tiedon mukaisesti. Perinnöllinen informaatio on koodattuna jokaiseen ihmisen solun tumaan DNA eli deoksiribonukleiinihap-

porihman muodossa. DNA:ssa on perintötekijät eli geenit, jotka sisältävät proteiinien synteesiin tarvittavan informaation. Proteiineja, eli geenituotteita tarvitaan sikiökehityksessä rakennusosina eri kudoksien ja solutyypin muodostumisessa sekä niiden toiminnan säätelyssä. (Frilander 2006: 14–17.)

Ihmisen koko genomissa on noin kolme miljardia emäsparia. Perimän läpiluenta ja genomien DNA-emäsjärjestyksen selvitys valmistui vuonna 2003 (Human Genome Project), projektin kestäessä yli 10 vuotta. Ihmisen genomien uudelleensekvensoinnit ja muut analyysit ovat tarkentaneet arviota ihmisen geenien määrästä. Ihmisellä arvellaan olevan 20 000 – 25 000 geeniä. (Alitalo 2014c; Frilander 2006:14; Human Genome Project 2013.)

DNA eli deoksiribonukleiinihappoketju muodostuu kahdesta rihmasta jotka muodostavat kaksoiskierteisen rakenteen. DNA:n rakennusosina ovat vastakkaisissa juosteissa olevat keskenään pariutuneet DNA:n perusyksiköt, nukleotidit sytosiini (C) ja guaniini (G) sekä tymiini (T) ja adeniini (A). Jokaisessa solussa perinnöllinen informaatio on koodattuna kahteen metriin DNA-rihmaa. Jotta kaksijuosteinen rihma mahtuisi vain vajaan 10 mikrometrin kokoiseen tumaan, se on pakattu tarkalla rakenteella ja tiiviisti histoni-proteiinien avustuksella. DNA on pakkautunut sekä löyhästi pakkautuneeksi eukromatiiniksi, jossa sijaitsevat geenit jotka ovat aktiivisia tai helposti aktivoitavissa, sekä tiiviisti pakkautuneeksi heterokromatiiniksi joka on geenitoiminnan kannalta inaktiivista. Lopullista tiivistä, pakattua rakennetta kutsutaan kromosomiksi (kuvio 2.). (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 9; Frilander 2006: 15–16, 32.)



Kuvio 2. DNA:n pakkautuminen kromosomin sisälle (Sha – Boyer 2009).

Tumallisille eliöille, eli eukaryoteille on tyypillistä, että eksonien eli valkuaisaineita koodaavien geenialueiden lisäksi geenit ovat jakautuneet myös koodaamattomiin geenialueisiin eli introneihin. Introneit eivät osallistu geenin koodaamaan proteiinisynteesiin. Genomista vain 1,5 % on eksoneita, lopun 98,5 %:n ollessa koodaamatonta aluetta. Koodaavan alueen pituus on keskimäärin noin 1500 emäsparia (base pair, bp). (Frilander 2006: 16–17; Nousiainen 2012.)

Perinnöllinen informaatio on talletettuna ihmisen DNA:han, josta geneettinen informaatio luetaan geenien ilmentymisen eli ekspression eri vaiheissa. On tärkeää, että yksittäiset geenit toimivat oikeissa kudoksissa oikeassa kehitysvaiheessa. Jos ilmentymisessä tapahtuu virheitä, voi se johtaa häiriöihin yksilönkehityksessä, syöpään tai muihin sairauksiin. Geenisäätelyä tapahtuu kaikilla geenin ilmentymisen tasoilla, erityisesti transkription, RNA-prosessoinnin ja translaation vaiheissa. (Frilander 2006: 14–15.)

2.2 Tutkimusmenetelmät alkiodiagnostiikassa

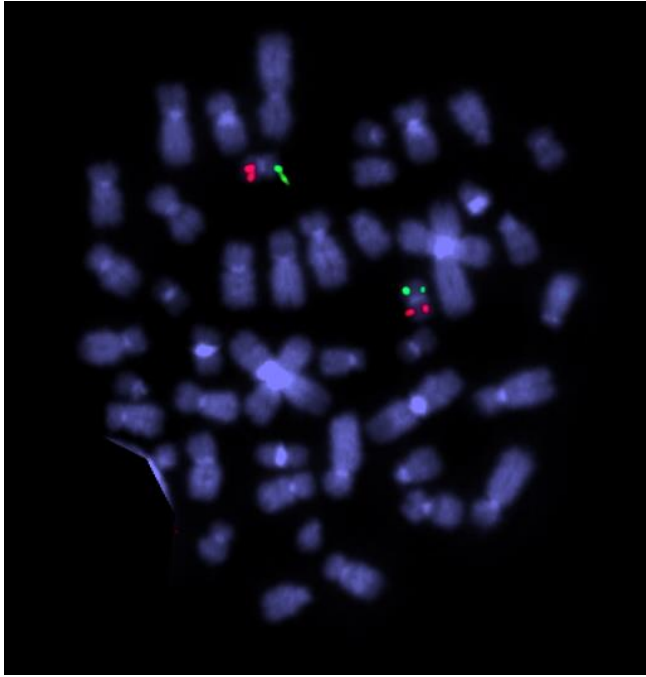
Yksittäisen solun irrottamisen jälkeen alkiodiagnostiikassa yleisimmin käytössä olevat tutkimusmenetelmät ovat FISH (Fluoresenssi in situ hybridisaatio) tietyn kromosomi-

alueen tai kromosomilukumäärän tutkimiseen sekä PCR eli polymeraasiketjureaktio (Polymerase chain reaction), jolla yksittäisen solun DNA:ta voidaan monistaa tutkittaessa yksittäisen geenin mutaatiota. (Aittomäki – Hovatta 2006: 215; Alitalo 2013a; Lähdetie – Horell-Kuitunen 2001: 2259–2260.) Tutkimusmenetelminä käyttää myös array-CGH- tai NGS-menetelmiä. Näiden käyttö edellyttää kuitenkin lähtömateriaaliksi suurempaa DNA-määrää kuin mitä tarvitaan FISH- tai PCR-tekniikkaan perustuvissa tutkimuksissa.

2.2.1 FISH – Fluoresenssi in situ -hybridisaatio menetelmä

FISH-menetelmällä voidaan tutkia luotettavasti esimerkiksi kromosomien lukumäärällisiä poikkeamia (trisomioita) tai rakenteellisia poikkeamia (translokaatioita) käyttämällä koettimia, jotka tunnistavat tietyt kromosomit/kromosomialueet. Menetelmä perustuu in situ -hybridisaatioon, jossa sekä näytteet, että koettimen DNA denaturoidaan yksijuosteiseksi, jonka jälkeen DNA-koetin yhdistyy sen emäsjaksoja vastaavan kohdekromosomin alueeseen suotuisissa olosuhteissa. Tätä vaihetta kutsutaan hybridisaatioksi. Tutkimuksessa tarvitaan tietyt kromosomi/kromosomilokus-spesifiset fluoresoivalla merkkiaineella leimatut koettimet, jotka fluoresenssimikroskoopin avulla tarkasteltaessa antavat tulkittavan tietynvärisen signaalin. Lokus-spesifisten koettimien koko vaihtelee yleensä 90-450 kb:n välillä, sentromeerispesifiset koettimet ovat suurempia. Translokaatioita tutkittaessa tarvitaan jokaiseen translokaatioon spesifiset koetinyhdistelmät. Tutkimusta rajoittavat saatavilla olevat koettimet sekä niiden rajattu signaalivärivalikoima samassa hybridisaatiossa. Tosin asia voidaan ratkaista tekemällä 2-3 hybridisaatiota samalle tumalle/metafaasille. (Alitalo 2014c; Lähdetie – Horell-Kuitunen 2001: 2260; Suominen ym. 2010: 203; Knuutila 2012a.)

Alla olevassa kuviossa on näkymä fluoresenssimikroskoopista, jossa kromosomin q- ja p-käsivarret on leimattu eri väreillä. Kromosomin pidempi käsivarsi q näkyy punaiseksi värjäytyneenä ja lyhyempi käsivarsi p vihreäksi värjäytyneenä. Kuvassa käytettyjä maalauskoettimia ei voida käyttää alkiodiagnostiikassa.



Kuvio 3. Fluoresenssi in situ hybridisaatio (HUSLAB Genetiikan laboratorio 2014).

Fluoresenssi in situ -hybridisaation etuina on sen herkkyys (1/100 – 1/1000). Menetelmällä voidaan kromosomeissa osoittaa spesifiset geenimonistumat, -puuttumat sekä fuusiogeenit. FISH voidaan tehdä myös interfaasivaiheen soluihin. Sitä ei kuitenkaan voida käyttää koko genomin laajuiseen selvitykseen. (Knuutila 2012b.)

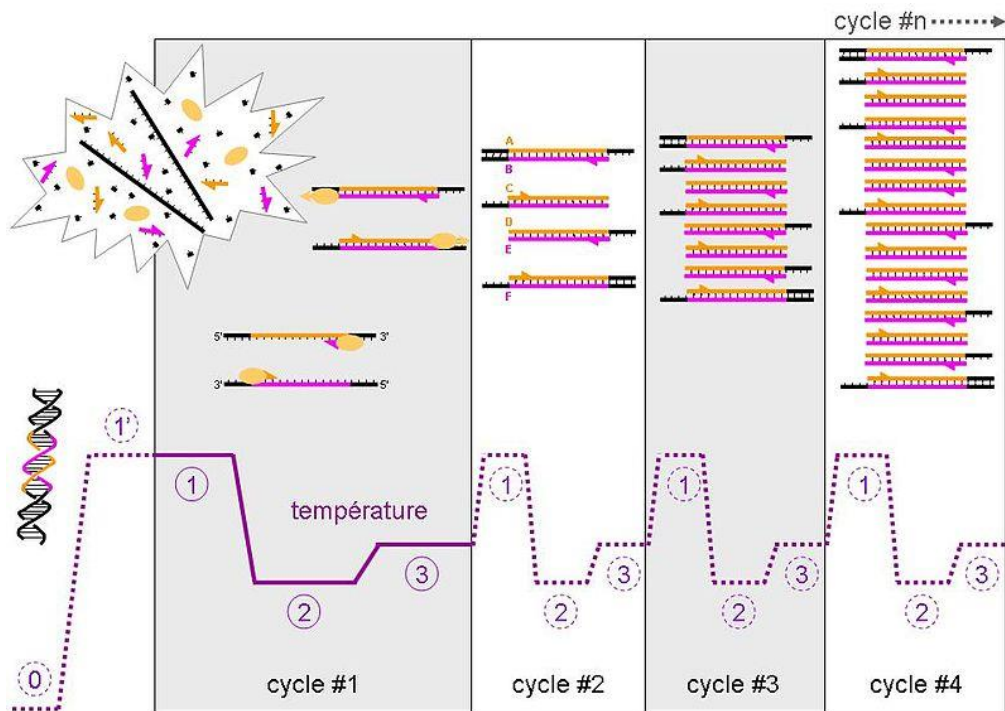
Array-CGH-tekniikka tulee korvaamaan ja on jo useissa laboratorioissa korvannut FISH-tekniikan alkiodiagnostiikassa (Alitalo 2014c; Vanneste – Bittman – Van de Aa – Voet – Vermeesch 2012: 1). Tulevaisuudessa NGS puolestaan tulee korvaamaan array-CGH-tekniikan. Muussa diagnostiikassa FISH säilyy rinnakkaistutkimuksena, sillä toistaiseksi menetelmällä saadaan esimerkiksi lisätietoa poikkeamista jotka on havaittu array-tutkimuksissa sekä tietoa niistä balansoiduista kromosomien rakenteellisista muutoksista jotka eivät tule esille array-tutkimuksissa. (Alitalo 2014c.)

2.2.2 PCR – Polymeraasiketjureatio

Alkiodiagnostiikan yhteydessä voidaan käyttää polymeraasiketjureaktioon perustuvaa PCR-menetelmää tietyn DNA-sekvenssin monistamiseen. Tietyn DNA-sekvenssin monistamisen avulla voidaan tutkia perheessä tunnistettuja geenimutaatioita jotka aiheuttavat sairauksia. Menetelmässä käytetään avuksi alukkeita, eli synteettisesti valmistettuja lyhyitä nukleiinihapposäikeitä monistettavan alueen kummaltakin puolelta, polyme-

raasientsyymiä sekä sykleittäin vaihtuvaa lämpötilaa. (Alitalo 2014c; Knuutila 2012c; Lähdetie – Horell-Kuitunen 2001: 2261.)

Polymeraasiketjureaktio-nimen polymeraasi viittaa DNA:ta monistavaan polymeraasiin ja ketjureaktio monistusreaktion toistamiseen uudelleen 20–30 kertaa. PCR-laite toimii eräänlaisena lämpöhauteena, joka pystyy tarkasti muuttamaan lämpötiloja hyvin nopeasti. PCR-syklissä toistuvat denaturaatio (kaksinauhainen DNA denaturoituu yksijuosteiseksi), annealing (alukkeet kiinnittyvät mallina toimivaan yksijuosteiseen DNA:han) sekä elongaatio/ekstensio (pidennysreaktio) -vaiheet (kuvio 4.). Lämpöä kestävät DNA-polymeraasit, jotka monistavat DNA:ta, on eristetty esimerkiksi bakteereista, jotka elävät kuumissa lähteissä, joten ne kestävät kuumuutta hyvin (esimerkiksi *Thermus aquaticus* -bakteerista saatu Taq DNA-polymeraasi). (Pärssinen ym. 2012: 179–181.)



Kuvio 4. PCR-syklin vaiheet 1–3: denaturointi, alukkeiden kiinnitys ja pidennysreaktio (Ygonaar 2006).

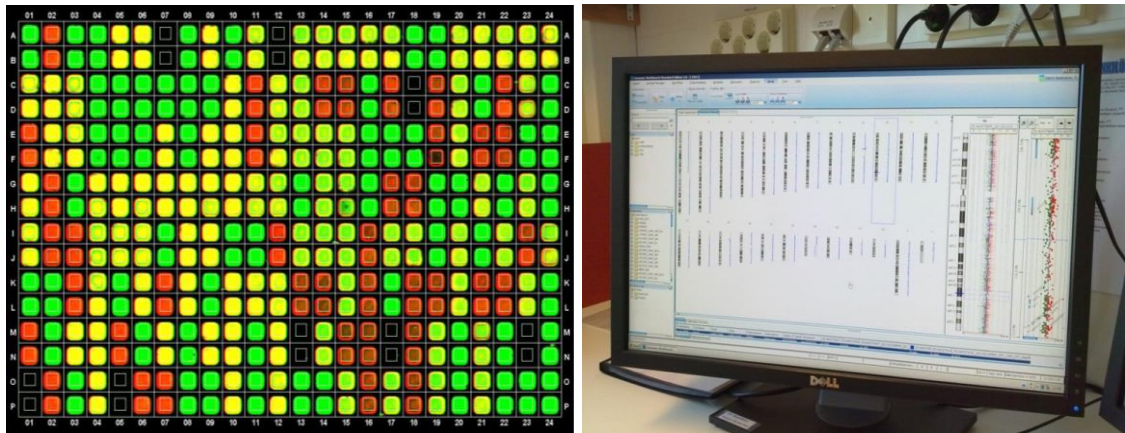
Polymeraasiketjureaktiossa käytetään noin 20 nukleotidin mittaisia, tietokoneohjelman avulla suunniteltuja alukkeita, jotka on suunniteltu niin, ettei monistettavasta DNA:sta löydy muualta samanlaisia kohtia (Pärssinen ym. 2012: 179). DNA:sta monistetaan alukkeiden välinen alue. Alukkeet tunnistavat monistettavasta DNA:sta alueet, joissa on sen vastinemäsjärjestys. Menetelmän aluksi DNA-säikeet erotetaan toisistaan lämpötilaa nostamalla. Alukkeet kiinnittyvät vastinjuosteisiin kun lämpötilaa lasketaan.

Lämpötilan noston ja DNA-polymeraasientsyymin avulla tehdään reaktioliuoksessa olevista nukleotideista DNA:n vastinjuoste. Syklejä toistamalla saadaan aikaan alueen eksponentiaalinen monistuminen. Saatu DNA-määrä voidaan havaita ja tulos tulkita lopuksi esimerkiksi elektroforeesigeelierottelulla. Alkiodiagnostiikan yhteydessä saadaan monistettavaksi erittäin pieni solumäärä, joten menetelmä on erityisen herkkä virhelähteille kun tiettyä geenialuetta lähdetään monistamaan moninkertaiseksi. Yksi virhelähde on suuri kontaminaatoriski. (Alitalo 2014c; Knuutila 2012c; Lähdetie – Horell-Kuitunen 2001: 2261.)

2.2.3 Array-CGH

Array-CGH-menetelmästä on käytössä eri nimityksiä, muun muassa aCGH, aVGH, molekyylirikaryotyyppitys ja mikrosirututkimus. Menetelmässä yhdistyy syto- ja molekyyligenetiikkaa ja sen avulla saadaan laajasti tietoa DNA:n poikkeavuuksista. Sillä voidaan tehdä koko genomin kattava analyysi DNA:n kopiomäärän muutoksista (häviämät, ylimäärät ja runsaat monistumat) eksoni- ja jopa emästasolla. (Knuutila 2012d; Knuutila 2012e; Suominen ym. 2010: 206–209.) CGH nimitys tulee englannin kielen sanoista comparative genome hybridization, eli kilpaileva genominen hybridisaatio (Zheng – Wang – Li – Jin 2011: 3).

Array-tekniikka perustuu hybridisaatioon, eli yksijuosteisten nukleiinihappojen sitoutumiseen hybridisaatiossa. Tutkimusnäytteen, sekä normaalin kontrollinäytteen vertailevan näytteen erivärisillä merkkiaineilla (Cy3 vihreä ja Cy5 punainen) leimatut DNA:t kilpailevat sitoutumisesta alustaan kiinnitettyihin koettimiin/oligonukleotidikoettimiin. Värien intensiteettiä voidaan vertailla mittaamalla sirun oligoiden antamat fluoresenssisignaali-intensiteetit hybridisaation ja pesujen jälkeen. Signaalien mittaaminen tapahtuu siihen tarkoitettulla laitteella ja analyysiohjelmalla. Muokkaamalla saatua dataa tietokoneavusteisesti, saadaan tietoa kopiokokumuutoksista (kuvio 5). (Alitalo 2014c; Suominen ym. 2010: 206–209.)



Kuvio 5. Molekyylikaryotypitys (Äikäs 2013). Kuvissa nähdään fluoresoivaa DNA:ta sitoutuneena koetinpisteisiin mikrosirulla (tutkittava DNA punainen, referenssi-DNA vihreä) sekä analyysiohjelman avulla numeromuotoon muutetut kopiokummutokset tietokoneruudulla.

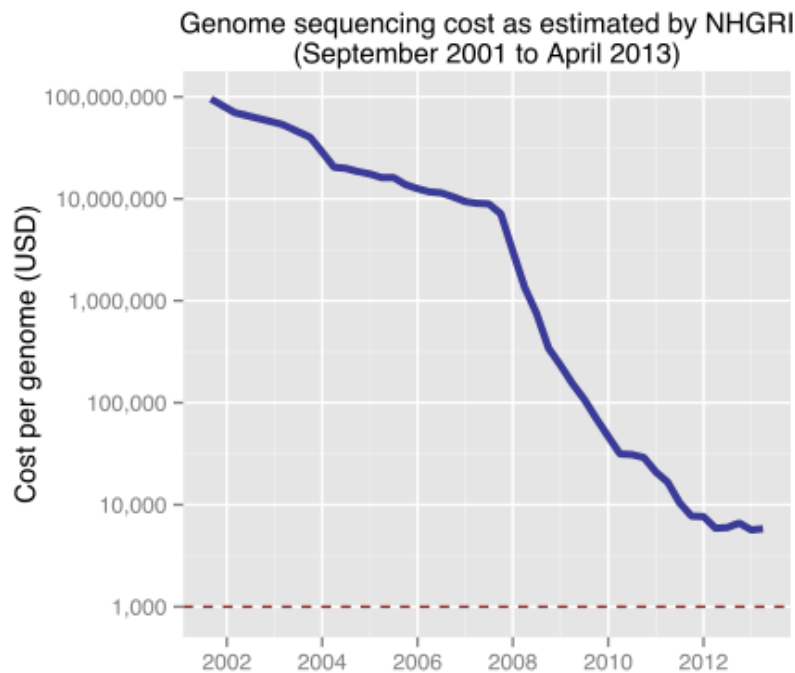
Molekyylikaryotypityksellä havaitun poikkeaman löytyminen edellyttää, että poikkeavuus esiintyy ainakin 30–50 %:ssa näytteen soluista. Menetelmän puutteena voidaan pitää myös sitä, että balansoidut translokaatiot eivät tule esille (geenien uudelleenjärjestymät). (Knuutila 2012e.)

2.2.4 NGS – Next Generation Sequencing

Sekvensoinnin avulla voidaan selvittää tutkittavan näytteen genomin emäsjärjestys. Vertaamalla tätä tunnettuun normaalisekvenssiin, pystytään havaitsemaan poikkeamat nukleotidijärjestyksessä sekä mahdolliset tautimutaatiot. (Orpana – Huoponen 2006: 275.) Ihmisen koko genomin sekvensointi on tutkimusten mukaan edesauttanut tuntemattomien tautimutaatioiden löytämisessä. Eksomisekvensointi on käytännöllinen, jos potilaan kliininen taudinkuva on epäselvä, ei tiedetä tarkalleen mitä etsitään eikä perinteisellä geenidiagnostiikalla ole löydetty mutaatiota. (Nousiainen 2012.)

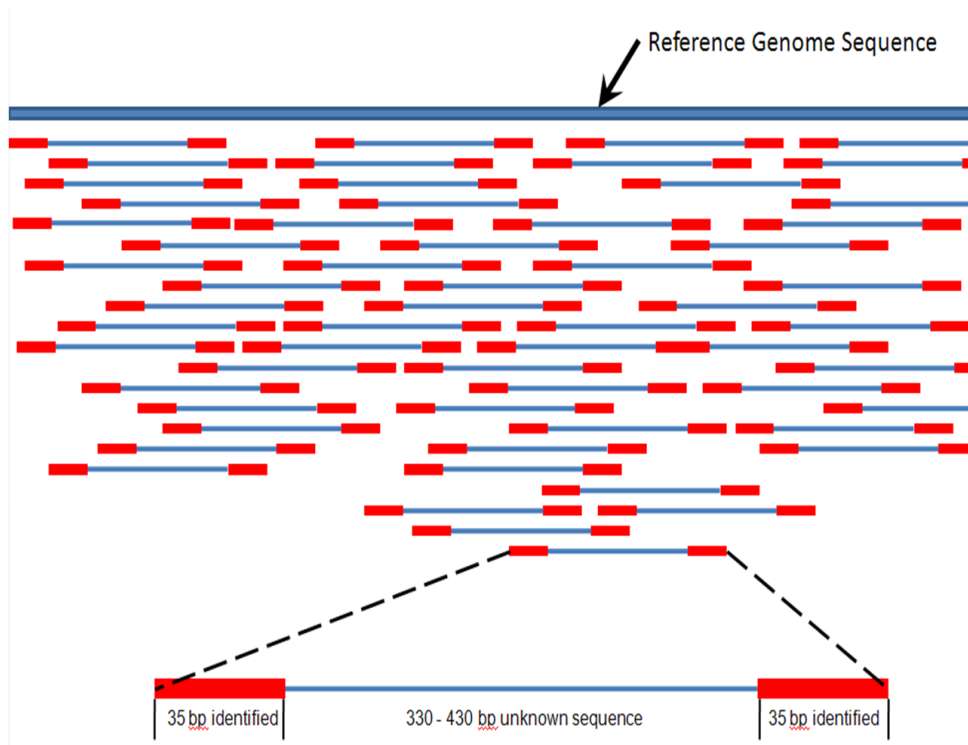
Vaikka perinteisillä, jo 1900-luvun lopulla kehitetyillä sekvensointimenetelmillä kuten esimerkiksi Sangerin sekvensointimenetelmällä ja PCR:llä, on edelleen paikkansa jokapäiväisessä genetiikan laboratorion rutiinikäytännöissä, on tiedon lisääntyminen lisännyt tarvetta laajempaan ihmisgenomin sekvensointiin. Tieto on kehittynyt nopeasti, tästä esimerkkinä 2000-luvulla kehitetty koko genomin sekvensointi (NGS, eli Next Generation Sequencing). Menetelmä on nopea ja mahdollistaa suuren DNA-määrän sekvensoinnin sekä tiedon tallentamisen. Menetelmä on lisännyt valmiuksia yhä laajempaan sekvensointiin yhä nopeammin, samalla vähentäen analyysin kustannuksia sek-

venssiä kohden (kuvio 6.). (Klug – Cummings – Spencer – Palladino 2012: 565–567.) NGS tulee tulevaisuudessa korvaamaan perinteisiä geenitestejä perinnöllisissä sairauksissa (Nousiainen 2012).



Kuvio 6. NGS:n kustannukset 2002–2013 (Moore 2014).

NGS ei rajoitu vain muutamien pitkien fragmenttien käsittelyyn, vaan se mahdollistaa usean potilaan näytteen ja usean geenialueen samanaikaisen sekvensoinnin hyvin nopeassa ajassa. NGS-menetelmässä näytteen genomisen DNA eli gDNA katkotaan lukuisiin pieniin, sattumanvaraisiin emäsjonoihin eli fragmentteihin, jotka voidaan järjestelmällisesti ja tarkasti sekvensoida miljoonien rinnakkaisten reaktioiden avulla. Vaikka sekvenssi koostuu hyvin lyhyistä fragmenteista, emäsjonojen uudelleen järjestäminen ja kokoaminen tunnetun referenssigenomin avulla paljastavat tutkittavan näytteen koko genomien emäsjärjestyksen ja mahdollistavat näin koko genomien sekvensoinnin (kuvio 7.). (Illumina 2013.)



Kuvio 7. Next Generation Sequencing (Spencer 2011).

NGS-menetelmää ei ole vakiintuneesti käytetty sikiödiagnostiikassa, mutta muutamien laboratorioden kokemusten perusteella menetelmää voidaan käyttää luotettavasti alkiodiagnostiikassa. NGS-menetelmää voidaan käyttää myös yhdistettynä PCR-analyysiin. Vertailtaessa esimerkkitapauksia vakiintuneisiin jo käytössä oleviin tutkimusmenetelmiin, ovat NGS:llä saadut tulokset luotettavia ja tehokkaita niin ajallisesti kuin kustannustenkin osalta. NGS soveltuu diagnostiikkaan erityisesti silloin, kun tutkimusmateriaalina käytetään blastokystivaiheessa irrotettuja soluja. (Alitalo 2014c; Treff – Fedick – Devkota – Taylor – Scott 2013.)

3 Koko genomin monistaminen (WGA) alkiodiagnostiikassa

Alkiodiagnostiikan yhteydessä tutkittavaksi saadaan hyvin pieni määrä DNA:ta, mikä tekee analysoinnista haastavan. Yhdessä alkion solussa on keskimäärin 6 pikogrammaa DNA:ta. Kun array-tutkimus tehdään tavallisella monistamattomalla DNA:lla, tarvitaan esimerkiksi Agilent-valmistajan siruille 500 nanogrammaa DNA:ta. WGA eli koko genomin monistaminen (Whole genome amplification) mahdollistaa pienen näyttemateriaalin monistamisen jatkotutkimuksia varten. (Alitalo 2014c; Vanneste ym. 2012: 1.)

Menetelmän tavoitteena on monistaa rajoitetusta lähtömateriaalista identtinen, korkean konsentraation omaava uusi näyte jota on mahdotonta erottaa alkuperäisestä näytteestä. Vuonna 1992 kehitettyä menetelmää on hyödynnetty muun muassa ihmisen syöpäkasvaimien analyysin sekä alkiodiagnostiikan yhteydessä. (Keer – Birch 2008: 179.)

Koko genomin monistamisen avulla voidaan poistaa monia ongelmia, joita on esiintynyt aiemmin alkiodiagnostiikan yhteydessä, kun käytössä on ollut pelkästään FISH- ja PCR-pohjaiset tutkimusmenetelmät. Huolimatta pienestä lähtömateriaalista, yhdestä solusta, voidaan menetelmän avulla monistaa koko genomi ja säilyttää alkuperäinen emäsjärjestys. WGA on mahdollistanut tutkimusmenetelmien laajemman käytön alkiodiagnostiikan yhteydessä, sillä diagnostiikkaa voidaan nyt tehdä tekniikoilla, joita ei olisi mahdollista käyttää ilman koko genomin monistamista. (Zheng ym. 2011: 1–2.)

Ensimmäiset tutkimukset laajojen geenikappaleiden monistamiseen suunnattiin ihmisen genomin hajautettuihin DNA-pätkiin, Alu-elementteihin. Tämä tarjosi helpon tavan tiettyjen kromosomialueiden eristämiseen ja analysointiin. Menetelmä todettiin kuitenkin epäluotettavaksi monistusmenetelmäksi johtuen Alu-elementtien vaihtelevista toistojaksoista sekä epäsäännöllisestä levinneisyydestä ihmisen genomiin. Tämän jälkeen on kehitetty useita eri monistusmenetelmiä, jotka eroavat toisistaan esimerkiksi toimintaperiaatteen ja replikaatiotehokkuuden mukaan. Kuudesta tutkituimmasta WGA-menetelmästä neljä on tullut tunnetuimmaksi. Näistä kolme pohjautuu PCR-tekniikkaan ja yksi MDA (Multiple displacement amplification) -tekniikkaan. Nämä pääsuuntaukset ovat saaneet jalansijan koko genomin monistamisessa. Näiden lisäksi WGA-monistusta voidaan tehdä myös LMP (Ligation Mediated PCR) sekä TLAD (T7-based Linear Amplification of DNA) -tekniikoilla. (Keer – Birch 2008: 179; Zheng ym. 2011: 2.)

Monistusmenetelmän valinta on tärkeä vaihe genetiikan tutkimusmenetelmiä kehitellessä, koska sillä on vaikutusta tutkimustuloksiin. Vaikka monistusmenetelmiä on kehitelty ja paranneltu paljon vuosien ajan, tulokset voivat kuitenkin vaihdella monistustuotteen puhtauden, saannin ja virheettömyyden suhteen. Kun lähtömateriaali on pieni, kasvattaa se todennäköisyyttä monistustuotteen epätarkkuuteen ja virhetuloksiin. (Hughes – Arneson – Done – Squire 2005: 178; Vanneste ym. 2012:1–2.)

Vääriä tuloksia monistusreaktion aikana voivat aiheuttaa esimerkiksi ADO (allele drop out) tai PA (preferential amplification). Näissä alleelin monistuminen eroaa toisten alleelien monistumisesta, se jää esimerkiksi monistumatta verrattuna muihin, normaalisti

monistuneisiin alleleihin. Alleeli on tietyssä geenin tarkassa paikassa (lokuksessa) sijaitseva geenin tai DNA-sekvenssin vaihtoehtoinen muoto. Lokuksen kahdesta alleelistista toinen on peritty isältä, toinen äidiltä. Geenihävikkiin johtavia virheitä tapahtuu vaihtelevasti, esimerkiksi MDA-menetelmän yhteydessä voi ADO:n esiintyvyys olla noin 10–40% ja PA:n esiintyvyys noin 7–60%. Myös mikrosatelliittien luennassa voi tapahtua virheitä. Nämä ovat tyypillisiä virheitä kun lähtömateriaali on pientä, etenkin PCR-pohjaisille monistusmenetelmille. (Zheng ym. 2011: 5; Aula – Kääriäinen – Palotie 2006: 351.)

3.1 PCR-tekniikkaan perustuva WGA

Polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvat menetelmät kuuluivat ensimmäisten koko genomin monistuksessa käytettävien tekniikoiden joukkoon. PCR-menetelmään pohjautuvia koko genomin monistusmenetelmiä on kehitetty useita, näistä esimerkkinä jo vuonna 1992 kehitetyt DOP (Degenerate Oligonucleotide Primed) ja PEP (Primer Extension Preamplification) sekä myöhemmin julkistettu I-PEP (Improved PEP). (Hughes ym. 2005: 173, 177–178, Vanneste ym. 2012:1–2.)

PCR-pohjaisissa monistusmenelmissä hyödynnetään tavallisen polymeraasiketjureaktion tapaan sykleittäin vaihtuvaa lämpötilaa sekä alukkeita. DOP-menetelmässä käytetään Taq-polymeraasia sekä puoli-generoituja alukkeita, jotka sitoutuvat noin miljoonaan eri kohtaan genomissa useiden matalalämpötilaisten monistussykliä aikana. DNA:n aloitusmäärä monistettaessa DOP-PCR:n avulla voi olla 15 pg:n ja 400 ng:n välillä. Saatavan DNA-monistustuotteen määrä on pituudeltaan keskimäärin 400–500 bp. Määrä riittää CGH-analysointiin, joka vaatii onnistuakseen 100 ng–1 µg DNA:ta tai vastaavasti 10 000 solua. (Keer – Birch 2008: 179; Zheng ym. 2011: 3).

PEP-menetelmässä hyödynnetään asteittain nostettavaa lämpötilaa, Taq-polymeraasia sekä 15 emäksen mittaista primeria, joka koostuu useista eri sekvensseistä ja näin kiinnittyy satunnaisesti kopioitavan juosteen eri sekvenssialueisiin. Satunnaisten alukkeiden käyttö on parantanut monistustuloksia verrattuna DOP-menetelmään. Menetelmän avulla saadaan monistustuotetta, joka on pituudeltaan samansuuntaista DOP-PCR-menetelmän kanssa. Menetelmä on havaittu hyväksi etenkin parafiininäytteitä analysoitaessa. I-PEP on vuonna 1999 keksitty, niin kutsuttu paranneltu versio PEP:stä, jossa on hyödynnetty oikolukuaktiivisia entsyymejä sekä muutettu PCR syklien olosuhteita. Muutosten myötä on pystytty parantamaan monistustuloksia verrattuna

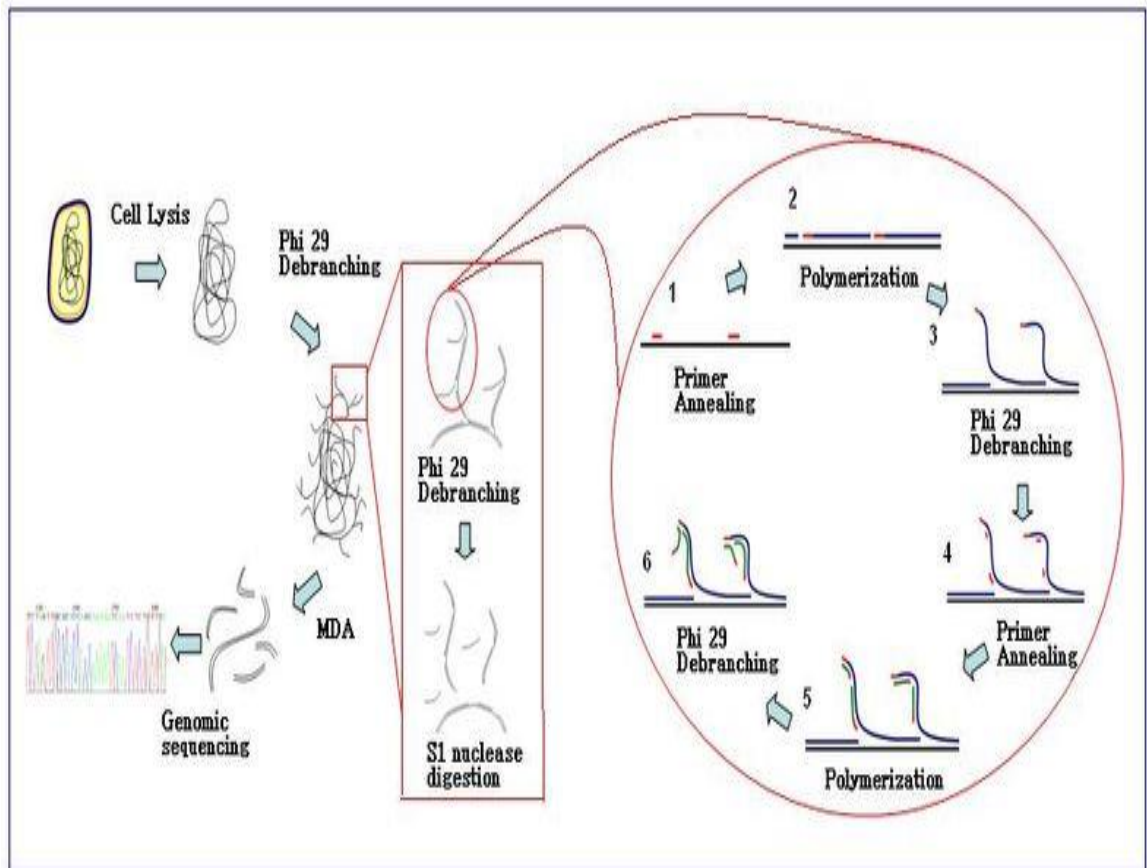
PEP-menetelmään etenkin lähtösolumäärän ollessa vähäinen (1–5 solua). (Arneson – Hughes – Houlston – Done 2008:1; Hughes ym. 2005: 177–179; Keer – Birch 2008: 179.)

On olemassa tutkimuksia, joiden mukaan PCR-tekniikkaan perustuvat monistusmenetelmät olisivat alttiita satunnaisille häiriöille (esimerkiksi drop out), mutta menetelmiin on myös viime aikoina kehitetty parannuksia. DOP-PCR-menetelmästä on syntynyt vuonna 2009 myös paranneltu versio dcDOP-PCR, jonka tuloksena on syntynyt aiempaa parempia tuloksia koko genomin monistuksessa, mutta menetelmä vaatii vielä lisää tutkimustuloksia ennen laajempaa käyttöönottoa. (Hughes ym. 2005: 173, 177–178, Vanneste ym. 2012:1–2; Zheng ym. 2011: 3–4).

3.2 MDA-tekniikkaan perustuva WGA

MDA (Multiple Displacement Amplification) -menetelmä on isoterminen, ei PCR-tekniikkaan perustuva monistustekniikka. Monistaminen tapahtuu vakiolämpötilassa käyttäen hyväksi esimerkiksi Phi-29 DNA-polymeraasia sekä eksonukleasiresistentejä alukkeita. Verrattuna PCR-pohjaiseen reaktioon, ei tarvita siis sykleittäin vaihtuvaa lämpötilaa. Polymeraasilla on 3'→5' oikolukuaktiivisuus ja kyky liikkua pitkin templaattijuostetta muodostaen korkeamolekyyllipainoista DNA:ta (jopa 70 kb). MDA-tekniikka on tutkimuksissa tuottanut lähes virheetöntä tulosta, joten sitä voidaan pitää tehokkaana monistusmenetelmänä koko genomin monistamisessa. (Qiagen REPLI-g Midi Kit 2013; Vanneste ym. 2012:1–2.)

Phi29 polymeraasin vaihtoehtona menetelmässä voidaan käyttää Bst-polymeraasin ja T4 geeni 32 proteiinin sekoitusta, Phi29-polymeraasin ollessa kuitenkin tutkimusten mukaan tehokkain. Alukkeet kiinnittyvät useisiin kohtiin denaturoidussa DNA:ssa ja monistavat polymeraasin avulla tuhansia emäksiä käyttäen yksijuosteista DNA:ta templaattina. Reaktion edetessä tapahtuu aina uusia alukkeiden kiinnittymisiä jokaiseen jo monistettuun juosteeseen, jotka toimivat vuorostaan templaatteina. Näin menetelmän avulla voidaan monistaa tuhansia kopioita genomista muutaman tunnin aikana (kuvio 8.). (Hughes ym. 2005: 173, 181.)



Kuvio 8. MDA-tekniikkaan perustuva koko genomien monistaminen (Qianli 2009).

MDA-menetelmän on havaittu tuovan mukanaan useita etuja verrattuna PCR-pohjaiseen monistusmentelmään. Menetelmä on tehokas ja se on tuottanut lukuisia hyviä tuloksia tutkimuksissa. Menetelmän avulla saatu monistustuote on yhtenäistä ja riittävää jatkotutkimuksia, kuten esimerkiksi array-CGH-tutkimusta tai single nucleotide polymorphism (SNP) -tutkimusta varten. (Zheng ym. 2011: 2).

3.3 Monistetun DNA:n laadun arviointi

Alkiodiagnostiikka asettaa tutkittavalle DNA:lle vaatimuksia esimerkiksi DNA:n määrän ja laadun suhteen, jotta sitä voidaan käyttää jatkotutkimuksissa. DNA:n pitoisuuden ja puhtausasteen määrittäminen on tärkeää tutkittaessa näitä asioita monistamisen yhteydessä. DNA:n analysoinnin apuna voidaan laboratoriossa käyttää erilaisia menetelmiä ja mittauslaitteita. Apuna voidaan käyttää esimerkiksi spektrofotometrimittauksia tai agaroosigeelielektroforeesia, tai molempia. Spektrofotometrimittauksella voidaan arvi-

oida nukleiinihapon puhtautta mittaamalla DNA:n absorbanssi. DNA-pitoisuuksia voidaan mitata vertaamalla niitä agarosigeelielektroforeesin avulla standardinäytteiden vastaaviin pitoisuuksiin. (Pärssinen ym. 2012: 161.)

3.3.1 DNA:n konsentraation ja puhtausasteen mittaaminen

DNA:n pitoisuuden mittaaminen spektrofotometrin avulla perustuu absorbanssin mittaamiseen eri aallonpituuksilla, 260 nm ja 280 nm. Proteiinien absorptiomaksimi on noin 280 nm:ssä, myös DNA absorboi vielä 280 nm:ssä. RNA, oligonukleotidit ja vapaat nukleotidit absorboivat voimakkaimmin 260 nm:ssä. Näiden arvojen suhteen avulla voidaan laskea määritelmä puhtaalle DNA:lle, joka on 1,8 ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). Puhtaalle RNA:lle arvo on 2,0, koska se absorboi 260 nm:ssä voimakkaammin kuin DNA, ja aiheuttaa läsnäolollaan nukleotidien kanssa absorbanssisuhteen suurenemista. Absorbtion avulla voidaan laskea myös DNA:n pitoisuus, joka perustuu DNA:n nukleotidien absorbtioon 260 nm:ssä. Puhdas DNA-liuos jonka absorbtio aallonpituudessa 260 nm on 1,0, on pitoisuudeltaan 50 µg DNA/ml. (Suominen 2010: 110–111.) Jos mittauksessa saadaan DNA:n absorbanssisuhdeluvuksi puhtaan DNA:n arvoa 1,8 alhaisempi suhdeluku, voi se johtua proteiiniepäpuhtauksista jotka ovat jääneet näytteeseen. Näytteessä oleva RNA tai vapaat nukleotidit voivat aiheuttaa puolestaan korkean suhdeluvun. (Pärssinen ym. 2012: 161.) Monet laitteet antavat tuloksen DNA:n pitoisuudesta ja puhtaudesta samalla mittaukerralla.

3.3.2 DNA:n analysointi agarosigeelielektroforeesilla

Agarosigeelielektroforeesin avulla saadaan DNA:n materiaali näkyviin. Tekniikka ei ole kovin tarkka DNA:n pitoisuuden arvioimiseen, mutta sen avulla voidaan arvioida hyvin näytteen laatua. Esimerkiksi RNA-epäpuhtaus näkyy tuloksessa. Agarosigeelielektroforeesin avulla erottuvat hyvin myös erimittaiset DNA-molekyylit, joten sitä voidaan käyttää arvioitaessa DNA:n kokoa. (Pärssinen ym. 2012: 161–163.)

Elektroforeesissa erilaiset molekyylit liikkuvat väliaineessa sähkökentän vaikutuksesta. DNA:n rungon fosfaattien ansiosta DNA:lla on negatiivinen nettovaraus, joten menetelmä sopii hyvin DNA:n analysointiin. Havainnoitaessa elektroforeesin tulosta UV-valon avulla, voidaan nähdä erikokoisten molekyyliden ajautuminen eri nopeuksilla gee-

lin lävitse. Visualisoinnin apuna käytetään DNA-molekyyliin tarttuvaa väriainetta. (Pärsinen ym. 2012: 161–163.)

3.3.3 NanoDrop ja Qubit® -mittauslaitteet

DNA:n konsentraation ja puhtausasteen mittaamisessa voidaan käyttää apuna erilaisia mittausrakenteita. Opinnäytetyössä tuloksia mitattiin kahdella eri mittausperiaatteeseen perustuvalla laitteella. NanoDrop 1000 -laite (Thermo Scientific) perustuu spektrofotometriseen mittaukseen, Qubit® 2.0 (Invitrogen life technologies) fluorometriseen mittausmenetelmään.

NanoDrop-laite mittaa näytteen absorbanssin UV-valon eri aallonpituuksilla esimerkiksi DNA:sta ja proteiineista. DNA:n konsentraatio ja puhtausaste saadaan mitattua 1 µl näytemäärästä. Mittauksessa ei tarvita kyvettejä eikä näytettä tarvitse laimentaa, näyte mitataan pipetillä suoraan laitteen kahden mittauspinnan väliin, josta laite mittaa konsentraation mittausjalustojen väliin muodostuneesta nestepylvästä näytteen läpi menevän tietyn aallonpituisen valon avulla. Laite mittaa laimentamatta myös korkeita konsentraatioita (max dsDNA 3700 ng/µl, ssDNA 2400 ng/µl, RNA 3000 ng/µl). Mittaustulos on luettavissa tietokoneen näytöltä mukana tulevan apuohjelman avulla. (Alitalo 2014b; NanoDrop 1000 Spectrophotometer 2008.)

Jos puhtausaste poikkeaa puhtaan DNA:n lukemasta (1,8), saattaa se johtua näytteessä olevista proteiineista, fenolista tai mahdollisista kontaminanteista jotka absorboivat lähellä aallonpituutta 280 nm. NanoDropilla saatu DNA-konsentraatiomittaustulos sisältää näytteen DNA:n lisäksi myös näytteessä mahdollisesti olevat kontaminantit (RNA, irralliset nukleotidit). Laite mittaa ng/µl arvon 260 nm aallonpituudessa koko mittausalueen ollessa 220–750nm. (Alitalo 2014b; NanoDrop 1000 Spectrophotometer 2008.)

Qubit® 2.0 fluorometrin konsentraation mittausperiaate perustuu fluoresoivan värin sitoutumiseen spesifisesti DNA:han, näin mittaus perustuu ainoastaan DNA:n mittaamiseen eivätkä mahdolliset kontaminantit ja epäpuhtaudet häiritse mittauksia. Kaksirihmaisen DNA:n lisäksi on mahdollista mitata RNA:ta tai proteiineja. Laite mahdollistaa mittaamisen myös hyvin laimeista ja pienikonsentraatioisista näytteistä, näyttemateriaaliksi riittää NanoDropin tavoin 1 µl näytettä. Laite on pienikokoinen, mittaustulokset voidaan nähdä suoraan laitteen kosketusnäytöltä tai siirtää muistitikun avulla tietokoneeseen. Laite vertaa mittaustulosta kahteen kalibroitaessa mitattuun standardiin. Mittauk-

sessä käytetään laitteen mukana tulevia kyvettejä sekä reaktioseosta mihin näyte laimennetaan 1:200 suhteessa. Kahden minuutin inkuboinnin jälkeen näyte on valmis mitattavaksi. Qubit®-laite ei mittaa lainkaan näytteen puhtausastetta. (Alitalo 2014b; Qubit® 2.0 Fluorometer 2010.)

NanoDropin käyttämä mittaussuomenetelmä, joka mittaa DNA:n konsentraation spektrofotometrin avulla aallonpituudella 260 nm, on yksi käytetyimpiä mittaussuomenetelmiä. Qubit®-laitteen avulla on mahdollista mitata näytteen pitoisuuksia tilanteissa, joissa NanoDrop ei anna luotettavaa mittaustulosta. Muun muassa eri mittaussualueet mahdollistavat laitteiden käytön erilaisissa tilanteissa; NanoDropin mittaussualue on 2 ng/μl–15000 ng/μl, Qubit®-laitteella mittaussualue on 0,01 ng–1000 ng/μl. Qubit® mahdollistaa myös esimerkiksi molempien, DNA:n ja RNA:n mittaamisen samasta näytteestä erikseen, mihin NanoDrop ei pysty. (Qubit® vs NanoDrop 2014.)

3.3.4 Monistustuotteen puhdistaminen

Opinnäytetyön yhteydessä käytettiin koko genomin monistamisen yhteydessä monistustuotteen puhdistamiseen Zymo Reserchin Genomic DNA Clean & tor -puhdistuspylväitä. Monistustuotteen puhdistaminen on koko genomin monistamisen yhteydessä tarpeellista riippuen monistustuotteen laadusta, käytössä olevasta kististä ja sen valmistajan suosituksista.

DNA:n puhdistus puhdistuspylväitä apuna käyttäen perustuu puhdistuspylväessä olevaan silikakalvoon, joka valikoivasti sitouttaa epäpuhtaudet ja nukleiinihapon silikaan kun näyte ja korkean ionivahvuuden omaava puskuri sentrifugoidaan kalvon läpi. Kalvoon jääneet epäpuhtaudet pestään pylvästä pois pesuliuoksen avulla. Puhdas nukleiinihappo saadaan irtoamaan silikasta käyttämällä matalan ionivahvuuden omaavaa liuosta, eluointipuskuria. (Solunetti 2006b.) Näyte ja Chip DNA Binding -puskuri eluoidaan sentrifugoinnin avulla pylvään läpi, jolloin eluoinnin tuloksena saadaan kontaminanteista puhdistettua DNA:ta. Genomic DNA Clean & tor -puhdistuspylväiden valmistajan mukaan eluoitu DNA soveltuu erityisen hyvin esimerkiksi PCR- ja NGS-analysointiin. (Zymo Research.)

4 Steriili työskentely WGA:n ja soluviljelyn yhteydessä

4.1 Aseptinen työskentely

Aseptiseen toimintaan kuuluvat olennaisena osana muun muassa työskentelytilojen ja -välineiden puhtaudesta huolehtiminen esimerkiksi desinfioinnilla ja steriloinnilla sekä asianmukaisten suojavaatetusten käyttö ja huolelliset työskentelytavat. Lisäksi myös esimerkiksi UV-valon avulla voidaan kontaminaatoriskiä pienentää.

Hyvä aseptinen toiminta ja desinfektio suojaavat elävää kudosta tai steriiliä materiaalia mikrobeilta tuhoamalla, estämällä tai poistamalla niitä (Ratia – Vuento – Laitinen 2010: 515). Aseptinen työskentely tapahtuu usein sille varatussa puhdistilassa sekä laminaarivirtauskaapissa, jotta mahdollinen kontaminaatio voidaan estää mahdollisimman tehokkaasti. Laminaari-ilmavirtauskaappi pitää työtilan puhtaana ja suojaa työntekijää käsiteltävältä materiaaalilta. Puhdistila on suljettu tila, jonka tarvittava puhtausluokitus voidaan järjestää esimerkiksi tuloilman suodatuksella sekä ylipaineistuksella. Laboratoriohoitaja pukee tilaan tullessaan suojavaatetuksen. Suojavaatetuksen puhtauden ja steriilien, työtilakohtaisten välineiden käytön lisäksi aseptisuudesta huolehditaan noudattamalla laboratoriolaitteiden puhtaanapito-ohjeita sekä huolehtimalla henkilökohtaisesta hygieniasta. Etenkin käsihygienia ja suojakäsineiden asianmukainen käyttö on tärkeää. (Solunetti 2006a.) Aseptisiin työtapoihin kuuluu käsien puhtauden ja desinfioinnin lisäksi muun muassa suojavaatetuksen pukemisen ja riisumisen oikea järjestys sekä steriilien työvälineiden oikea käsittely. Myös oikeaoppinen työskentely laminaarivirtauskaapissa on tärkeää. Oikean aseptisen työskentelyn oppii harjoittelemalla sekä työvaiheiden järkevällä suunnittelulla. (Sojakka – Välimäki 2011: 61.)

Pintojen puhdistaminen sekä desinfiointi on tehtävä huolellisesti ennen aseptisen työskentelyn aloittamista. Työskentelyyn on käytettävä ainoastaan puhtaita työvälineitä sekä työtilaa. Pinta voi olla puhdas niin fysikaalisesti, kemiallisesti kuin mikrobiologisesti. Fysikaalisesti pinta on puhdas kun siinä ei näy likaa, mikrobiologisesti se on puhdas vasta kun siinä ei ole eläviä mikrobeja. Pinta tai esine on steriili, jos siinä ei ole likaa, mikrobeja, itiöitä eikä entsyymejä. Steriloinnilla voidaan tuhota ja poistaa kaikki mikro-organismit ja niiden lisääntymismuodot. Työvälineet voidaan steriloida esimerkiksi kuumentamalla tai autoklavoimalla, joiden avulla voidaan denaturoida eliöiden proteiini-

nit. Steriilit työvälineet pestään ennen autoklavointia sekä pakataan suojauspusseihin. (Sojakka – Välimäki 2011: 29–33.)

Desinfioinnilla puhdistetaan pintoja, jotka eivät kestä kuumentamista. Peruspesu yhdessä desinfioinnin kanssa oikein suoritettuna tuhoaa jopa yli 99 % mikrobeista. Laboratorion desinfiointia vaativien suojakaappien, esimerkiksi laminaarivirtauskaappien materiaalit ovat tehty helposti pestäviksi. Kemikaalien avulla tehtävä mikrobiologinen puhdistaminen tehdään mekaanisen pesun jälkeen kun pinnat ovat fysikaalisesti ja kemiallisesti puhtaat. Pesuaine huuhdellaan vesijohtovedellä, kahdesti deionisoidulla vedellä ja suihkutetaan alkoholiliuoksella. Proteiinien denaturointi vaatii myös vettä, joten 70-prosenttinen etanoli on tehokkainta desinfiointiin sen vaikutusajan ollessa vähintään puoli tuntia. (Sojakka – Välimäki 2011: 49–50, 54.) Joiltakin valmistajilta löytyy myös erikseen DNA-työskentelyyn tarkoitettuja puhdistusliukuksia kontaminaatoriskin ehkäisemiseksi, niin kutsuttuja DNA- ja RNAaasi-OFF-tuotteita, joita voidaan käyttää erityisesti PCR-työskentelyn yhteydessä. Tuotteiden avulla voidaan DNA poistaa kokonaan kaikilta pinnoilta.

UV-valo eli ultraviolettisäteily estää kontaminaatiota laboratoriotyöskentelyn yhteydessä. Sitä käytetään fysikaalisena sterilointimenetelmänä, jonka steriloiva vaikutus perustuu säteilyn aiheuttamiin muutoksiin nukleiinihapoissa ja proteiineissa. Bakteerisoluja UV-valotettaessa niiden molekyylit ärsyyntyvät, molekyylit muuttuvat reaktiokykyisiksi, solun normaali toiminta estyy, kasvu pysähtyy ja solu kuolee. Ultraviolettisäteilyn aallonpituusalue on 100–400 nm, mikrobeja tappaa tehokkaasti aallonpituudet 240–280 nm. Se pystyy läpäisemään muutaman solukerroksen ja on parhaimmillaan sileiden ja fysikaalisesti puhtaiden pintojen steriloinnissa. Laboratoriossa UV-lamppuja käytetään muun muassa laminaarivirtauskaapissa varmistamaan pinnan mikrobiologista puhtautta. Tällöin on tarkistettava, että UV-valo saavuttaa kaikki steriloitavat pinnat, eikä katvealueita jää. UV-valo steriloi vain pinnat, johon säteily osuu. (Sojakka – Välimäki 2011: 45.) Tutkimuksen mukaan koko genomin monistamiseen käytettyjen MDA-reagenssien säteilytys UV-valolla auttaa ehkäisemään kontaminaation syntymistä häiritsemättä esimerkiksi polymeerasin aktiivisuutta. (Woyke – Sczyrba – Lee – Rinke – Tighe – Clingenpeel – Malmström – Stepanauskas – Cheng 2011).

Tutkimuksessa (Shaw – Sesardić – Bristol – Ames – Dagnall – Ellis – Whittaker – Daniel 2008), jossa verrattiin eri aallonpituudella tapahtuvaa säteilytystä (UV, beta, gamma) ja etyleenioksidin käyttöä DNA-kontaminaation estäjänä todettiin, että kaikista te-

hokkaimmin DNA-kontaminaatio pystyttiin poistamaan etyleenioksidikaasukäsittelyllä. Säteilytyksestä tehokkain oli gamma-säteily UV-valon tullessa vasta viimeisenä tutkimustuloksia analysoitaessa.

4.2 Kontaminaatoriski

Etenkin koko genomin monistamisen yhteydessä mahdollinen pienikin kontaminaatio voi johtaa helposti virheellisiin tuloksiin. Yhdessä kohde-DNA:n kanssa monistunut kontaminoitunut DNA voi sekoittaa tutkimustulokset ei-halutun DNA:n kanssa (Woyke – Sczyrba – Lee – Rinke – Tighe – Clingenpeel – Malmström – Stepanauskas – Cheng 2011). Alkiodiagnostiikkaa ja koko genomin monistamista toteutetaan yleensä työtiloissa, joissa on oma ilmastointi/hepasuodatin, UV-valo, laminaari, sulkutila vaatteiden vaihtoon (kertakäyttöiset suojavaatteet niin että tutkimuksen tekijästä ei irtoa kontaminoivia soluja). (Alitalo 2014b).

Koko genomin monistaminen muutamasta solusta on hyvin altis kontaminaatiolle, ja jo työntekijästä mahdollisesti irtoavat solut voivat olla kontaminaatiolähde. (Alitalo 2014a). Kun menetelmällä monistetaan templaatti-DNA:ta, myös mahdollinen kontaminaatio monistuu tehokkaasti. Laboratoriotyöskentelyssä tarvitaan erityistä tarkkuutta ja huolellisuutta pipetointimäärien ja reaktiilavuuksien ollessa hyvin pienet. Lopputulokseen vaikuttavat reaktion komponenttien määrät ja suhteet toisiinsa, joten jo pienikin poikkeama voi sotkea reaktio-olosuhteet. Pipetointitaidon lisäksi vaikutusta on myös pipeteilla ja pipettien kärjillä. (Pärssinen ym. 2012: 182–183.)

Jotta kontaminaatiolta vältyttäisiin PCR-työskentelyn yhteydessä, tulee kiinnittää huomiota moniin asioihin. Näistä esimerkkeinä ovat oikeaoppisesti käytetyt suojavarusteet, huolelliset työskentelytavat sekä käytetyt pipetit. Reagensseja tulisi käyttää pienissä erissä ja hävittää ne käytön jälkeen. Sisältö sentrifugoidaan pois putken korkista ennen reagenssiputken avaamista. Pipetoitaessa tulisi olla käytössä vain PCR-työskentelyyn varatut pipetit sekä sopivat suodatinkärjet. Hyvänä esimerkkinä ovat niin kutsutut positiivikorvauspipetit jotka estävät aerosolihiukkasten siirtymisen ilmaan. Näytteet tulisi käsitellä ja reaktioseokset valmistaa ja pipetoida eri tilassa kuin missä monistettujen näytteiden analysointi tapahtuu. On myös muistettava, että pienikin kontaminaatio monistuu sitä tehokkaammin mitä suurempaa monistusmäärää tavoitellaan. Näin ollen pienempään herkkyyteen tyytyminen voi olla myös tavoiteltavaa paremman lopputuloksen saamiseksi. (Pärssinen ym. 2012: 183.)

Koko genomien monistamiseen ja PCR-työskentelyyn liittyen tehtiin Suomessa 1990-luvun lopulla tutkimus, jossa käytettiin blastomeerien monistamisessa onnistuneesti PEP-pohjaista PCR-monistusmenetelmää. Tutkimuskohteena olivat kolme suomalaiseen tautiperintöön kuuluvaa perinnöllistä tautia, AGU-tauti eli aspartyyilglukosaminuria, FAF eli suomalainen perinnöllinen amyloidoosi (familial amyloidosis, Finnish type) ja varhaislapsuudessa etenevä hermostotauti infantiili neuronaali seroidilipofuskinoosi INCL. Monistustuotteen analysoinnissa käytettiin menetelmänä minisekvensointia. Tutkimuksen yhteydessä saatiin tietoa myös menetelmistä, joilla mahdollinen kontaminaatio pystytään estämään PCR-pohjaisen monistusmenetelmän yhteydessä. Tutkimuksessa todettiin kontaminaation välttämisen olevan tärkeää erityisesti alkiodiagnostiikan yhteydessä, jossa monistettavana on ainoastaan yksi solu, eikä monistusta pystytä toistamaan samalla solulla. Tutkimuksen edetessä vaadittiin useita työvaiheita, ennen kuin monistaminen onnistuttiin suorittamaan ilman kontaminaatiota. Tutkimuksessa käytettiin kontaminaation kontrolloimisessa apuna nollanäytteinä veden lisäksi myös reaktiomix-näytteitä. Kontaminaatio estettiin vasta, kun kaikki työvaiheet tutkimuksessa suoritettiin eri työhuoneissa, käytettiin kontaminaation estäviä työvälineitä ja reagensseja sekä käytössä olleet tilat UV-valotettiin usean tunnin ajan ennen työskentelyn aloittamista. Sen lisäksi, että PEP-menetelmä toi ajallista voittoa verrattuna aikaisemmin käytössä olleisiin menetelmiin, koko genomien monistaminen PEP-menetelmän avulla pienensi myös kontaminaation riskiä käsittelyjen vähentyessä. (Paunio – Reima – Syvänen 1996; Pihlaja 2014.)

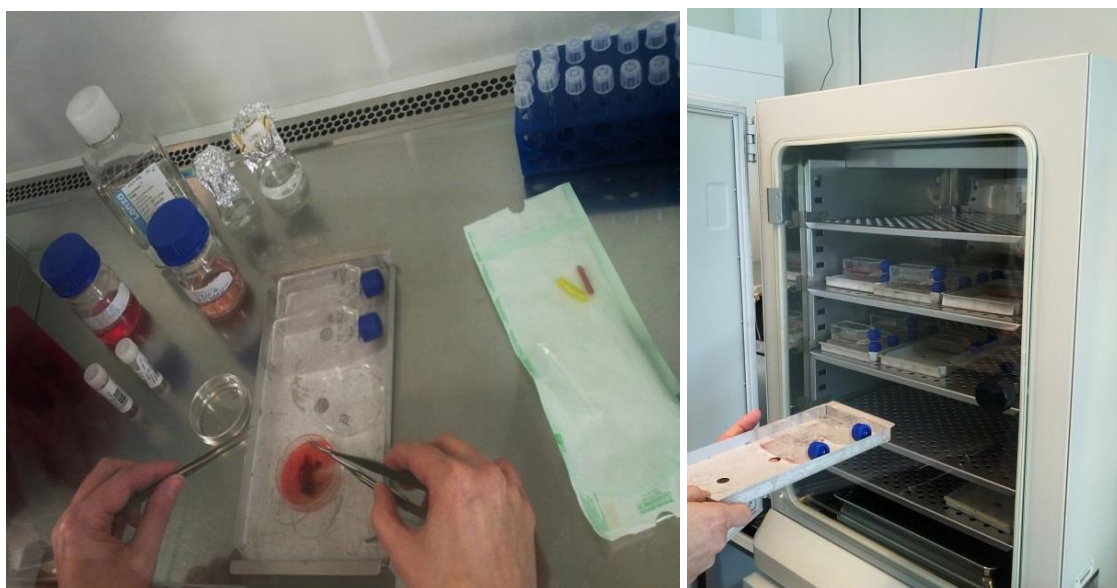
4.3 Solujen viljeleminen

Solujen viljelyä käytetään erilaisissa tutkimusmenetelmissä, esimerkiksi kromosomi-, IVF-, kantasolu- ja syöpätutkimuksissa sekä virusviljelyssä. Tutkimuksien avulla voidaan selvittää muun muassa solunsisäisiä toimintoja kuten DNA- ja proteiinisynteesiä, energiametaboliaa ja solusykliä sekä solunulkoisia toimintoja, kuten RNA-synteesiä, aineiden kuljetusta ja reseptoreiden toimintaa. (Pihlaja 2006.)

Koko genomien monistaminen voidaan tehdä alkion solujen lisäksi myös muille soluille tai komplementaariselle DNA:lle. Lähtömateriaalina olevat solut voivat olla lähtöisin erikudosmateriaalista, esimerkiksi kudospalasta. Opinnäytetyössä käytettiin solumateriaalina istukka-, lapsivesi- ja ihosoluja ennen alkion blastomeereillä tapahtuvaa monistamista. Jotta esimerkiksi kudospalan solumateriaali saadaan monistettavaan muotoon,

tulee monistettavaksi tarkoitettuja soluja viljellä sopivissa olosuhteissa halutun solumäärän saavuttamiseksi. Myös solujen viljely tapahtuu steriilityöskentelynä laboratoriossa ottaen huomioon mahdolliset kontaminaation aiheuttajat.

Kudoksen saapuessa laboratorioon, kudospala puhdistetaan ja hajotetaan esimerkiksi mekaanisesti saksilla leikkaamalla. Useimmat solut tarvitsevat kiinteän kasvualustan kasvaakseen. Näyte siirretään ravintoliuoksen kanssa kasvualustalle. Kasvualustana voi toimia esimerkiksi soluviljelypullo, jossa solut kiinnittyvät pullon pohjaan. Solut käyvät viljelyssä läpi valikoitumisen, jossa elinkykyiset solut jakaantuvat ja valtaavat kasvualaa osan solujen kuollessa. Viljelmää seurataan säännöllisesti. Solujen aineenvaihdunta kuluttaa ravinteita ja tuottaa aineenvaihduntatuotteita ravintonesteeseen, joten ravintonestettä on vaihdettava soluviljelyn edetessä. Usein vaihdon tarpeen ilmaisee ravintonesteen muuttuneesta pH:sta johtuva liuoksen värin vaihtuminen. Viljelyn jatkuessa viljelmää voidaan kasvualustan täyttyessä jakaa alaviljelmiin tai esimerkiksi pakastaa mahdollisiin jatkotutkimuksiin. Usein solujen hajotuksessa ja kasvualustasta irrottamisessa käytetään trypsiiniä, joka katkoo solujen peptidisidokset. (Freshney 2005; Pihlaja 2006.)



Kuvio 9. Soluviljely ja solujen kasvatus lämpökaapissa (Äikäs 2013).

Pakastettavien solulinjojen on oltava hyvässä kasvussa ja kontaminaatiovapaita. Kontaminaatio soluviljelmässä voidaan havaita esimerkiksi ravintonesteen sameutena, solujen huonovointisuutena tai silmämääräisesti pulloviljelyä mikroskopoitaessa. Usein aiheuttajana ovat mikrobikontaminaatiot, kuten bakteerit, hiivat, homeet, sienet tai vi-

rukset. Kontaminaatio voi saada alkunsa monesta eri lähteestä. Syynä voivat olla esimerkiksi saastuneet työvälineet, näytteet, puutteelliset työtavat tai työntekijän suojauskäytännöt. Kontaminaatio voi tulla näytteeseen myös ilmasta tai viljelykaapista. Soluviljelytyöskentelyssä on otettava huomioon aseptiset työtavat ja työvälineiden steriiliys sekä huolellinen työskentelytapa. (Pihlaja 2006.)

5 Opinnäytetyön tavoite ja tutkimuskysymykset

Kromosomi-/geenitutkimus on muuttunut viime aikoina uusien menetelmien kehittymisen ja uuden tiedon löytymisen myötä. Koko genomin monistaminen on välttämätöntä, jotta alkiodiagnostiikan yhteydessä voidaan siirtyä käyttämään FISH-tutkimuksen ohella myös muita menetelmiä (aCGH/NGS). Uuteen menetelmään siirtyminen on ajankoh- taista ja tarpeellista genetiikan laboratoriolle.

Opinnäytetyön tarkoituksena on olla osana laboratorion alkiodiagnostiikkaan liittyvää kehitystyötä testaamalla koko genomin monistamiseen tarkoitettuja kitejä. Tavoitteena oli selvittää kittien hyödynnettävyys alkiodiagnostiikan yhteydessä. Kittien testaamisella haluttiin selvittää, voidaanko tutkimukseen valituilla kiteillä suorittaa koko genomin monistaminen onnistuneesti ja onko kittien suorituskvyssä eroa esimerkiksi monistettavan DNA:n määrän, puhtauden tai fragmenttikoon suhteen. Monistamisen tuloksena on saatava riittävästi tarpeeksi puhdasta DNA:ta, jotta jatkotutkimukset voidaan suorittaa ja kitti ottaa käyttöön alkiodiagnostiikan tutkimuksissa.

Opinnäytetyön tutkimuskysymykset joihin haluttiin vastaukset, olivat seuraavat:

1. Voidaanko tutkimukseen valituilla reagenssikiteillä suorittaa koko genomin monistaminen onnistuneesti?
2. Saadaanko DNA:ta monistettua tarpeeksi jatkotutkimuksia varten ja täyttääkö se konsentraatio- ja puhtausvaatimukset?
3. Kumpi kiteistä ja testattavista menetelmistä sopii tarkoitukseen paremmin (PCR vai MDA -pohjainen menetelmä)?

6 Opinnäytetyön suorittaminen

Opinnäytetyö on osa laboratorion alkiodiagnostiikkaan liittyvää kehittämisprojektia. Uusien menetelmien käyttöönotto on pitkä prosessi. Prosessi alkoi opinnäytetyön muodossa koko genomin monistamiseen tarkoitettujen kittien testaamisella. Opinnäytetyössä tehtiin valitulle näytemateriaalille koko genomin monistaminen tutkimukseen valituilla kiteillä sekä verrattiin saatuja tuloksia ja käytössä olleita menetelmiä. Laboratoriotyövaiheen päättymisen jälkeen projektia tullaan jatkamaan laboratoriossa.

Opinnäytetyön laboratoriotyövaihe toteutettiin sytogenetiikan laboratoriossa. Sytogenetiikan laboratorion tilat eivät täytä tällä hetkellä täysin kaikkia aseptisia vaatimuksia koko genomin monistamisen ja PCR-työskentelyn suhteen. Laboratorio ei esimerkiksi pysty tarjoamaan koko genomin monistamisen eri työvaiheille erillisiä työtiloja kontaminaatoriskin minimoimiseksi. Opinnäytetyön laboratoriotyövaiheeseen varatussa työtilassa työskenneltiin tilanpuutteen vuoksi samanaikaisesti myös muiden potilasnäytteiden sekä työtehtävien parissa.

Huolimatta tämänhetkisistä työskentelytiloista, haluttiin opinnäytetyön kokeellinen osuus suorittaa, jotta voidaan alustavasti verrata kittien eroavaisuuksia. Jatkossa, kun menetelmä otetaan laboratoriossa käyttöön, työtila muutetaan sellaiseksi että se täyttää paremmin genomin monistamiseen vaadittavat olosuhteet. Aseptiikasta huolehdittiin opinnäytetyön yhteydessä käytettävissä olevien mahdollisuuksien mukaan. Työvaiheet suoritettiin työhön varatussa laminaarivirtauskaapissa. Laminaarivirtauskaappi puhdistettiin ja desinfioitiin sekä UV-valotettiin ennen työskentelyn aloittamista. Työskentelyyn käytettiin työhön varattuja työskentelyvälineitä, esimerkiksi pipettejä ja filترillä varustettuja pipetinkärkiä. Opinnäytetyön tekijä käytti suoja-asuna laboratorion normaalia työasua sekä suojakäsineitä. Kaikki työvaiheet toteutettiin aseptista työtapaa ja huolellisuutta noudattaen.

Opinnäytetyön laboratoriotyövaihe suoritettiin kahtena peräkkäisenä työvaiheena. Työvaiheet jaettiin käytettävän näytemateriaalin mukaan. Ensimmäisessä työvaiheessa käytettiin kittien testaamiseen lapsivesi-, istukka- ja ihonäytteistä viljeltyjä soluja. Toisessa työvaiheessa siirryttiin IVF-yksiköstä saatujen alkion solujen genomin monistamiseen.

6.1 Käytetyt näytteet

Kittien testaamisessa käytettiin näytemateriaalina eri kudoksenäytteistä viljeltyjä soluja sekä poistoon menevien alkioden soluja, blastomeerejä. Kittien testaaminen aloitettiin käyttämällä näytemateriaalina istukka-, iho- ja lapsivesinäytteistä saatuja soluja. Tarkoituksena oli tutustua opinnäytetyöhön valittujen kittien toimintaan käyttäen ensin helpommin saatavilla olevaa näytemateriaalia ennen siirtymistä alkion soluihin.

Ennen laboratoriotyövaiheen aloittamista säilöttiin normaalin istukka-, iho- ja lapsivesinäytteiden käsittelyn yhteydessä ylimääräistä näytemateriaalia opinnäytetyötä varten. Näytteitä kerättiin potilasnäytteistä, joissa tiedettiin kromosomi tai DNA-tutkimusten perusteella olevan jokin kromosomipoikkeavuus tai geenimutaatio. Näin monistetusta DNA:sta saatuja tuloksia voidaan vertailla myöhemmin alkuperäisestä DNA:sta saatujen tulosten kanssa. Tämä työvaihe suoritetaan myöhemmin laboratorion toimesta eikä se kuulu osana opinnäytetyöhön. Näytteitä pakastettiin kymmenestä potilasnäytteestä, joista monistettiin opinnäytetyön yhteydessä kolmen näytteen soluja. Viljeltyjä soluja monistettiin kaikilla kolmella opinnäytetyöhön valitulla kiteillä.

Tutkimuksen edetessä saatiin IVF-laboratoriosta alkion blastomeerejä, joille tehtiin monistus tutkimukseen valituilla Single Cell -kiteillä. Blastomeerejä monistettiin opinnäytetyön yhteydessä yhteensä 14. Solujen lukumäärä vaihteli näytteittäin yhdestä solusta noin kymmeneen soluun riippuen missä alkion kehitysvaiheessa biopsia oli tehty.

6.2 Käytetyt kitit ja kittien vertailu

Opinnäytetyöhön valittiin yhteensä kolme kittiä joilla koko genomin monistaminen voidaan suorittaa. Kitit olivat kahdelta eri valmistajalta:

- Qiagen:
 - REPLI-g Midi Kit
 - REPLIg Single Cell
- New England BioLabs / Rubicon Genomics:
 - Single Cell WGA Kit

Valikoiduista kiteistä REPLI-g-kitit ovat MDA (Multiple Displacement Amplification) -tekniikkaan perustuvia kittejä ja Single Cell WGA Kit -kitti PCR-tekniikkaan perustuva

kitti. Kaikilla kiteillä monistettaessa voidaan lähtömateriaalina käyttää solumateriaalin lisäksi myös esimerkiksi genomista DNA:ta tai kokovera. Tässä opinnäytetyössä lähtömateriaalina käytettiin kaikkien kittien kohdalla solumateriaalia.

Molemmilta valmistajilta valittiin opinnäytetyöhön yksi Single Cell -kitti, jolla voidaan monistaa soluja lähtömateriaalin ollessa hyvin pieni. Qiagenilta oli mukana lisäksi Repli-g Midi -kitti, joka vaatii monistamisen lähtömateriaaliksi solususpensiota, jossa on vähintään 600 solua. Opinnäytetyön laboratorio-osuus aloitettiin Midi-kitillä kokeiltaessa ensimmäisen kerran menetelmän soveltuvuutta viljeltyihin soluihin. Monistamalla soluja aluksi Repli-g Midi -kitillä, voitiin selvittää mahdollisimman tarkasti solujen monistamisen vaatima oikea käsittely ennen siirtymistä Single Cell -kitteihin. Näin saatiin säästettyä Single Cell -kittien reagensseja blastomeerien testausvaiheeseen.

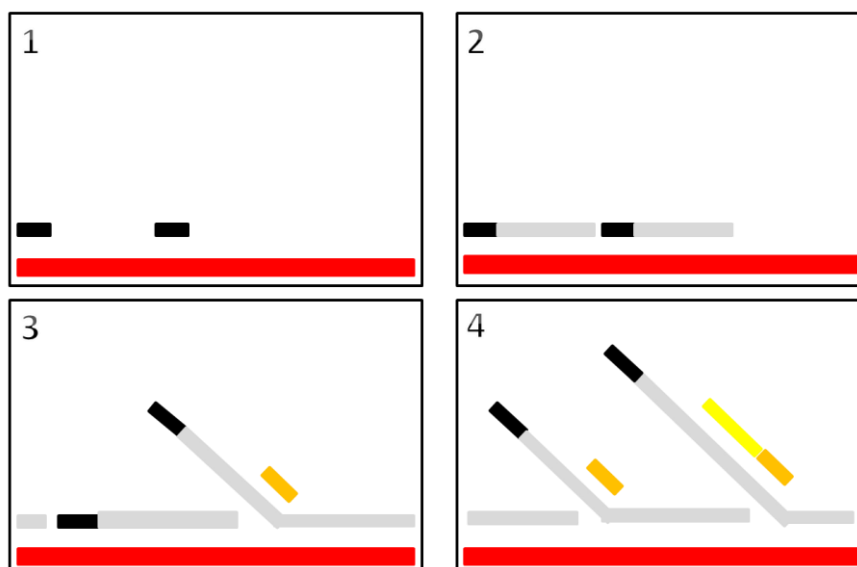
Huolimatta valmistajan asettamasta korkeammasta lähtömateriaalivaatimuksesta, käytetään Repli-g Midi -kittiä esimerkiksi Englannissa myös alkiodiagnostiikan yhteydessä. Kitti on saatu toiminaan erinomaisesti myös pienemmän lähtösolumäärän yhteydessä muuntelemalla hieman kitin ohjeita. (Alitalo 2014b.)

Qiagenin kitit perustuvat isotermiseen MDA (Multiple Displacement Amplification) -tekniikkaan. Näissä hyödynnetään tehokasta Phi29 polymeraasia, hellävaraista alkaalista, matalalämpötilaista denaturaatiota sekä irrallisia nukleotidejä jotka tarttuvat templaatti-DNA:han alukkeiden jälkeen. Matalalämpötilainen, hellävarainen alkaalinen denaturaatio mahdollistaa pitkien fragmenttien tuottamisen. Lämpötilan ollessa matala, vältetään esimerkiksi kuumentamisen yhteydessä tapahtunut DNA:n tuhoutuminen, mikä voi johtaa virheisiin monistustuotteissa. (Qiagen Repli-g Midi Kit 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013.)

Kittien valmistaja lupaa helpon, luotettavan ja virheettömän monistusmenetelmän, jota voidaan käyttää NGS ja Array-menetelmien lisäksi useiden muidenkin tutkimusmenetelmien yhteydessä ilman erikseen suoritettavaa monistetun DNA:n puhdistusta. Tutkimusten perusteella REPLI-g-kitit ovat tuoneet erinomaisia tuloksia erityisesti NGS-menetelmää käytettäessä. Menetelmää voidaan käyttää, vaikka lähtömateriaalina olisi vain yksi ainoa solu. Phi29 polymeraasi omaa korkean 3' -> 5' oikolukuaktiivisuuden ja tuottaa 1000-kertaisesti virheettömämpää tulosta verrattuna esimerkiksi Taq-polymeraasin avulla suoritettavaan monistukseen. Reagenssien valmistuksessa on

käytetty hyödyksi UV-valoa mahdollisen kontaminaation poissulkemiseksi. (Qiagen Repli-g Midi Kit 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013.)

Alla oleva kuvio havainnollistaa Phi 29-polymeraasin toimintaa. Templaattijuosteeseen sitoutuneiden alukkeiden (primereiden) sekä Phi 29-polymeraasin avulla juostetta pidentetään matalassa, 30 °C:een lämpötilassa. Phi 29-polymeraasi etenee pitkin DNA-templaattia syrjäyttäen komplementaarisen juosteen. Syntynyt juoste toimii puolestaan templaattina uudelle replikaatiolle. (Qiagen Repli-g Midi Kit 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013.)



Kuvio 10. Phi 29 polymeraasin toiminta MDA-monistamisessa (mukaillen Qiagen Repli-g Midi Kit 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013).

PCR-menetelmään perustuvan Single Cell WGA -kitin menetelmä perustuu lämpötilojen vaihteluun PCR-syklien aikana. Valmistaja ei mainitse kitin ohjeissa tarkemmin, mikä PCR-pohjainen WGA-monistusmentelmä (esimerkiksi DOP, PEP, I-PEP) on kyseessä tai mitä polymeraasia menetelmässä hyödynnetään. Menetelmä soveltuu käytettäväksi hyvin myös silloin, kun lähdemateriaali on hyvin pieni, yksi solu. Kitin avulla saavutetaan 95 % monistettavuus, kun lähtömateriaalina käytetään blastomeerejä. Riippumatta lähtösolumäärästä, on monistustulos aina yhtä tehokas. Kitti on kuitenkin erityisesti suunniteltu yhden solun monistamiseen. Kitin valmistajan mukaan menetelmän avulla saadaan monistettua DNA:n sekä AT että GC -rikkaat alueet. PCR-monistettua DNA:ta voidaan käyttää esimerkiksi array-CGH tai SNP (single nukleotide polymorphism) analysointiin ja sekvensointiin. Menetelmä ei kuitenkaan sovellu NGS-jatkotutkimukseen. Valmistaja suosittelee lähtösolumateriaalin pesua ennen monista-

misen aloittamista sekä monistustuotteen puhdistusta ja laadun määrittämistä ennen jatkoanalysointimenetelmiin siirtymistä. (New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014a; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b.)

Taulukko1. Kittien vertailutaulukko.

Kitti	Kitin periaate	Tarvittava solumäärä	Fragmentti-koko	Näytemäärä	Saanti	Suoritus aika
Repli-g Midi	MDA	> 600 solua/µl	>10 kb (2–100 kb)	3 µl (näyte + PBS)	800 ng/µl (40 µg/50 µl reaktio)	30 min + 8–16 h (16 h)
Repli-g Single Cell	MDA	1–1000 solua	>10 kb (2–100 kb)	4 µl (näyte + PBS)	800 ng/µl (40 µg/50 µl reaktio)	30 min + 8 h
Single Cell WGA Kit	PCR	1–1000 solua	~500 bp (200–1000 bp) (1 kb= 1000 bp)	5 µl (näyte + buffer / näyte + <2,5 µl PBS + buffer)	40 ng/µl (3–5 µg/75 µl reaktio)	3 h

Yllä olevaan taulukkoon on koottu kittien toiminnan suurimpia eroavaisuuksia. Qiagenin MDA-tekniikkaan perustuvilla kiteillä monistetun tuotteen tavoitesaanti on noin 800 ng/µl (40 µg/50 µl reaktio) riippuen lähtömateriaalin DNA:n laadusta. PCR-monistustuotteen tavoitesaanti on kitin tuotetietojen mukaan hieman alhaisempi, 40 ng/µl (3–5 µg/75 µl reaktio). Myös luvatussa fragmenttikokoissa on eroa, PCR-menetelmän monistaessa lyhyempiä fragmentteja. Molempien kittien monistustuote voidaan säilöä -20 °C:ssa. (Qiagen Repli-g Midi Kit. 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014a; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b.)

Tarvittava lähtönäytemäärä (solu/-t + esimerkiksi PBS) monistukselle on MDA-pohjaisissa kiteissä 3 µl (Midi Kit) tai 4 µl (Single Cell Kit) lopullisen kokonaisreaktiovolyymin ollessa yhdessä reaktiossa 50 µl. PCR-menetelmään tarvitaan lähtönäytemateriaaliksi 5 µl, myös kokonaisvolyymin reaktiossa on suurempi (75 µl). (Qiagen Repli-g Midi Kit. 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014a; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b.)

Repli-g-kittien ohjeiden mukaan DNA:n monistamiseen on varattava 8–16 tunnin inkubaatioajan lisäksi 30 minuutin valmisteluaika. Single Cell -kitin inkubaatioaika on työohjeen mukaan 8 tuntia. Midi-kitin inkubaatioaika voi olla 8–16 tuntia, jolloin parhain tulos saavutetaan maksimaalisella inkubaatioajalla. PCR-menetelmään perustuvan Single Cell -kitin hyviin puoliin voidaan lukea lyhyempi tekoaika. Koko prosessi vie työohjeiden mukaan kolme tuntia. Tähän aikaan sisältyy kolme PCR-syklikierrosta. (Qiagen Repli-g Midi Kit. 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014a; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b.)

Qiagenin Repli-g Midi -kitissä suositeltavan lähtömateriaalin solumäärä on vähintään 600 solua. Qiagenin Single Cell Kitissä voidaan monistaminen suorittaa jo yhdestä solusta (suositeltava solumäärä 1–1000 solua). PCR-monistusmenetelmällä voidaan myös monistaa DNA:ta huolimatta pienestä solumäärästä, siinä tarvittava lähtösolumäärä on 1–1000 solua. (Qiagen Repli-g Midi Kit. 2013; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014a; New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b.)

Qiagenin MDA-menetelmään perustuva monistaminen tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa solut hajotetaan ja denaturoidaan lyhyen inkubaation aikana. Denaturaatio lopettamisen jälkeen lisätään mastermix, joka sisältää muun muassa polymeraasin. Isoterminen monistamisreaktio tapahtuu 8-16 tunnin aikana matalassa lämpötilassa. (Qiagen Repli-g Midi Kit 2011; Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2012.) Myös PCR-monistaminen tapahtuu kolmessa vaiheessa; valmistelu-, esimonistus- ja monistusvaiheessa. Jokaisessa vaiheessa lisätään puskuri/mastermix sekä entsyymi, jonka jälkeen reaktiotuote käy läpi PCR-syklit. Monistaminen kestää kitin ohjeiden mukaan noin kolme tuntia. (New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b.)

Monistaminen opinnäytetyöhön valituilla kiteillä tapahtui valmistajan laatiman ohjekirjan ohjeiden mukaan. Ohjekirjat ovat luettavissa valmistajan internet-sivuilta.

6.3 Laboratoriotyövaiheet

Opinnäytetyön laboratoriotyövaihe toteutettiin tammikuussa 2014. Aikaa laboratoriotyövaiheelle oli varattu opinnäytetyöohjeiden mukaan kolme viikkoa. Laboratoriotyövaihe sisälsi kaksi erillistä työvaihetta, jotka oli jaoteltu käytettävän näytemateriaalin mukaan.

Perusperiaatteena molemmissa työvaiheissa olivat näytemateriaalin saaminen monistettavaan muotoon, näytteen DNA:n monistaminen kitin valmistajan ohjeiden mukaan, monistetun DNA:n mahdollinen puhdistaminen, DNA:n saannin ja pitoisuuden mittaaminen sekä monistustuotteen laadun analysointi agaroosigeelielektroforeesin avulla.

Monistustuotteen saanti mitattiin sekä NanoDrop 1000 spektrofotometrin (Thermo Scientific), että Qubit® 2.0 fluorometrin (Invitrogen Life Technologies) avulla. NanoDrop mittauslaite on laboratoriossa jatkuvassa käytössä, Qubit®-laite on laboratoriossa uusi, vielä testausvaiheessa oleva mittausmenetelmä. Saadun monistetun DNA:n laatua on jatkossa tarkoitus todentaa laboratoriossa myös muilla, jo käytössä olevilla menetelmillä (aCGH/NGS/minisekvensointi). Tarkoitus oli alun perin käyttää mittaamiseen ainoastaan NanoDrop-laitetta, mutta Qubit® otettiin mukaan mittauksiin työn edetessä, kun laite saapui laboratorioon. Tästä syystä aivan kaikkia monistettuja näytteitä ei ole mitattu Qubit®-laitteella. Mittaustuloksia vertailtiin tiettyjen näytteiden kohdalla myös puhdistamalla monistustuote Zymo Research DNA Clean & Concentrator -kitin avulla. Opin näytetyössä monistustuotteesta otettiin puhdistukseen 10 µl näytettä, joka laimennettiin 10 µl:aan TE-liuosta. Laimennettu näyte eluoiitiin 20 µl:aan eluointipuskuria.

Laitteissa mittaus tapahtuu eri tekniikoilla. NanoDrop perustuu absorbanssin mittaamiseen UV-valon eri aallonpituuksilla, Qubit®:n mittaus perustuu fluoresoivan värin sitoutumiseen spesifisesti DNA:han. Qubit® mittaa DNA:n konsentraation pelkästään kaksirihmaisesta DNA:sta mitaten ainoastaan näytteessä olevan DNA:n pitoisuuden. NanoDrop mittaa DNA:n lisäksi myös RNA:n sekä irralliset nukleotidit. Erona laitteissa on myös puhtausasteen mittaus sekä poikkeavat mittausalueet. Qubit® ei mittaa lainkaan näytteen puhtausastetta (260/280 absorbanssisuhde), joten puhtausastemittaukset perustuvat ainoastaan NanoDrop-laitteen mittaustuloksiin. Qubit®:n mittausalue on matalampi kuin NanoDropissa. (Alitalo 2014b.)

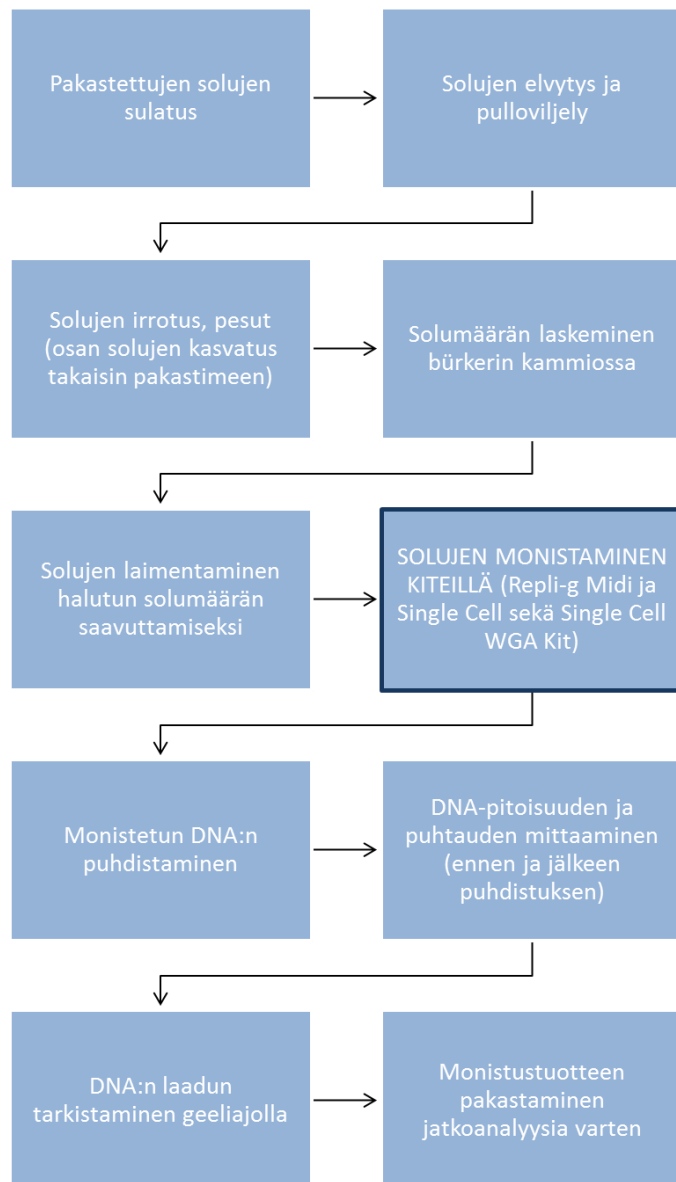
6.3.1 Laboratoriotyövaihe 1 – viljeltyt solut

Monistaminen kiteillä aloitettiin viljellyillä istukka-, iho- ja lapsivesinäytteistä saaduilla soluilla. Tarkoitus oli tutustua kittien toimintaan soluilla ennen siirtymistä blastomeerien monistamiseen. Ensimmäiseen laboratoriotyövaiheeseen käytettiin ajallisesti kaksi viikkoa.

Tavallisen näyteprosessin analysoinnin aikana yli jääneet, poistoon menevät solut oli kerätty talteen sekä pakastettu -140°C :een. Solut elvytettiin pakastimesta ja siirrettiin kasvamaan viljelypulloihin sopivan ravintonesteen kanssa. Soluja viljeltiin pullojen pohjan kasvualustalla lämpökaapissa keskimäärin kahden vuorokauden ajan riippuen solujen kasvunopeudesta. Solujen kasvua seurattiin päivittäin ja tarvittaessa pullojen ravintoneste vaihdettiin tai viljelmä jaettiin useampaan pulloon. Kun solumäärä oli riittävä, solut irrotettiin kasvualustastaan viljelypullon pohjalta trypsiinin avulla ja siirrettiin näyteputkeen, jossa suoritettiin solujen pesu PBS-liuoksella.

Viljeltyjen solujen yhdessä pullossa oleva solumäärä vaihteli näytteittäin. Työvaiheen haluttiin olevan verrattavissa monistamiseen alkion blastomeereillä, joten viljeltyjen solujen määrä oli selvitettävä ja näytteen solumäärä oli saatava mahdollisimman pieneksi vastaamaan alkiosta irrotettavien blastomeerien määrää. Näytteen solumäärä laskettiin bürkerin kammiossa. Saadun tuloksen perusteella näyte laimennettiin oikean solumäärän saavuttamiseksi kulloinkin käytettävissä olevan kitin asettaman suosituksen mukaan. Monistamista kokeiltiin eri solumäärillä kittien valmistajan asettamien lähtösolumäärien rajoissa.

Monistamisen jälkeen monistustuotteen laatua ja määrää arvioitiin mittaamalla DNA:n pitoisuus ja puhtausaste sekä ajamalla monistustuote agarosigeelielektroforeesilla. Alla on kaavion muodossa prosessin eteneminen vaiheittain.



Kuvio 11. Laboratoriotyövaiheet viljellyillä soluilla.

Näytteiden solujen irrottaminen, laskeminen, laimentaminen ja itse monistaminen tehtiin viidessä eri vaiheessa. Työvaiheet on nimetty numeroitain työvaiheesta 1, työvaiheeseen 5. Solumäärän laskeminen pulloviljellyille soluille ja solususpension laimentaminen tarvittavan vahvaiseksi tehtiin ensimmäistä kertaa, joten prosessissa edettiin kokeilun kautta vaiheesta toiseen. Prosessin edetessä työvaiheesta seuraavaan, työmenetelmiä muutettiin sen mukaan, mikä vaikutti olennaisesti lopputulokseen.

Soluja oli säilötty kymmenestä eri näytteestä, joista kolme monistettiin kaikilla testaukseen valituilla kiteillä viidessä eri vaiheessa. Testattavat näytteet ja vaiheet olivat:

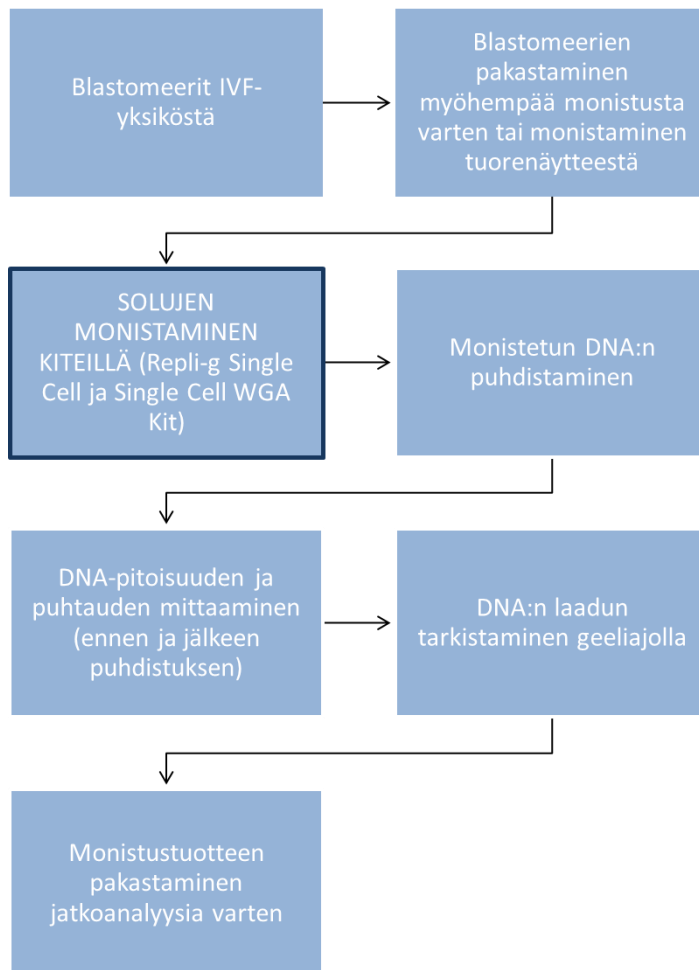
1. Näyte 186 (lapsiveden soluja) – ei monistettu
2. Näyte 163 (ihon soluja) – Repli-g Midi Kit (MDA)
3. Näytteet 106, 122 (istukan soluja) – Repli-g Midi Kit (MDA)
4. Näytteet 106, 122 ja 163 – Repli-g Single Cell Kit (MDA)
5. Näytteet 106, 122 ja 163 – Single Cell WGA Kit (PCR)

Näytteen 186 kohdalla ei saatu riittävästi soluja monistukseen, joten se jäi pois ensimmäisen vaiheen jälkeen monistusprosessista.

6.3.2 Laboratoriotyövaihe 2 – alkiot

Viljeltyjen solujen monistamisen jälkeen siirryttiin blastomeerien monistamiseen. Alkiot monistettiin vain testaukseen valituilla Single Cell -kiteillä. Tämä työvaihe kesti viikon.

IVF-laboratoriosta saatiin tuoreita blastomeerejä 16 eri näytteestä. Ensimmäisten näytteiden saapuessa monistettiin osa näytteistä heti, muut näytteet pakastettiin ja loput monistuksista suoritettiin sulatetuista alkioin soluista. Prosessi eteni samaan tapaan kuin viljellyillä soluilla, lukuun ottamatta solujen alkuvalmisteluja ennen monistamista. Solut saatiin laimennettuna PBS-liuokseen, joten monistaminen voitiin aloittaa heti. Alla on kaavio prosessin etenemisestä.



Kuvio 12. Laboratoriotyövaiheet alkioilla.

Alkion soluja saatiin testattavaksi 16 näytteessä, joista monistettiin 14 (näytteet 10 ja 12 jätettiin monistamatta). Testaukset suoritettiin neljässä työvaiheessa. Testattavat näytteet ja työvaiheet olivat:

1. Alkiot 1, 2 ja 5 – Repli-g Single Cell (MDA)
2. Alkiot 3, 4, 6, 7, 8 – Single Cell WGA Kit (PCR)
3. Alkiot 13, 14, 16 – Single Cell WGA Kit (PCR)
4. Alkiot 9, 11, 15 – Repli-g Single Cell (MDA)

Näytteiden solumäärä vaihteli yhdestä solusta 30 soluun riippuen siitä, missä vaiheessa biopsia oli tehty. Blastomeerien määrä tarkistettiin IVF-laboratoriossa mikroskoopilla biopsian yhteydessä. Blastomeerien määrä vaihteli näytteittäin seuraavasti:

1. ~9 solua

2. ~5 solua
3. 7–10 solua
4. ~30 solua
5. 7–10 solua
6. >30 solua
7. 1 solu
8. 1 solu
9. 1 solu
10. 1 solu
11. ~5 solua
12. ~3 solua
13. 7–10 solua
14. ~3 solua
15. ~2 solua
16. ~2 solua

Osa näytteistä oli otettu samasta alkioista useassa eri biopsiassa. Alkiot jaettiin testausvaiheisiin 1–4 niin, että testaukseen saatiin mahdollisimman monipuolisesti eri solumääräisiä näytteitä sekä eri alkioita. Samoista alkioista olivat näytteet:

- 2, 3 ja 4
- 5 ja 6
- 7, 8, 9 ja 10 sekä
- 15 ja 16.

Ensimmäinen testaus suoritettiin tuoreista alkioista, muut testit suoritettiin pakastetuista ja sulatetuista näytteistä.

7 Tulokset

Opinnäytetyön tulokset on esitelty kahdessa eri osassa erillisten laboratoriotyövaiheiden mukaan.

7.1 Laboratoriotyövaihe 1 – viljeltyt solut

Viljeltyjen solujen monistaminen suoritettiin viidessä eri vaiheessa. Viljeltyjen solujen esikäsittelyvaihe ennen kiteillä monistamista vei yllättävän suuren osan laboratoriotyövaiheeseen varatusta ajasta. Solujen valmistelu monistamiseen ja kittien testaus eteni vaiheesta toiseen, jolloin jokaisen vaiheen jälkeen muutettiin lopputulokseen vaikuttavia tekijöitä sen mukaan, miten saatiin parhain lopputulos. Seuraavilla asioilla todettiin olevan merkitystä onnistuneen lopputuloksen saamiseksi:

- Vaiheessa 1 testattiin PBS:llä suoritettavien solujen pesukertojen ja sentrifugoinnin kierrosnopeuden merkitys saatavaan solumäärään solujen viljelypullosta irrotuksen jälkeen.
 - Todettiin, että kahden pesukerran jälkeen soluja oli vähemmän, joten solujen irrotuksen jälkeen tehtiin jatkossa soluille vain yksi pesukerta. Sentrifugoinnin kierrosnopeuden muuttamisella ei ollut vaikutusta solumäärään.
- Vaiheessa 1 testattiin pesujen jälkeen saatavan solunapin laimentamisen vaikutus saatuun solumäärään.
 - Todettiin, että solunappia ei kannata laimentaa. Laimentamisen yhteydessä solumäärä pieneni, eikä monistettavaksi saatu tarpeeksi soluja.
- Vaiheessa 2 testattiin, onko laskentaan otettavien solujen määrässä vaihtelua sen mukaan otetaanko laskentaan koko pullon solut vai vain osa soluista.
 - Todettiin, että solumäärä riittää monistamiseen paremmin, jos laskentaan otetaan koko viljelypullon solut.
- Vaiheessa 2 testattiin monistustuotteen mittaamisen yhteydessä käytettävän nollanäytteen liuoslaadun merkitys lopputulokseen.
 - Testattiin sekä veden, että TE-liuoksen käyttö nollanäytteenä. Todettiin, että TE-liuos toimii nollanäytteenä paremmin. Tuloksissa ei kuitenkaan ollut suurta eroa.
- Vaiheessa 3 testattiin solujen bürker-laskennassa käytettävien eri laimennusliuosten merkitys solun laskentaan.
 - Testattiin solujen laskenta 1:10 laimennoksella sekä etikkahappoon että trypan blue -liuokseen. Todettiin, että trypan blue -liuos tuotti paremman tuloksen.
- Kaikissa vaiheissa testattiin monistustuotteen puhdistuksen vaikutus mittaustuloksiin sekä saman näytteen eri solumäärien merkitys monistustulokseen.

- Todettiin, että monistustuotteen puhdistus tuotti paremmat tulokset mittaessa monistustuotteen puhtautta (260/280), mutta monistustuotteen puhdistuksen yhteydessä menetettiin myös DNA:ta. Saman näytteen eri solumäärillä ei todettu olevan merkitystä monistustulokseen.

Liitteestä yksi (Koko genomien monistamisen tulokset – viljeltyt solut) selviää kittien testauksen tulokset viljellyistä soluista työvaiheittain 1–5.

Tulokset saatiin kaikista muista työvaiheista, paitsi ensimmäisestä työvaiheesta. Tässä työvaiheessa testattiin eri menetelmillä, miten solut saadaan monistettavaan muotoon solumäärän pysyessä tarpeeksi suurena sekä erilaisia laimennossarjoja. Johtuen jo alun perin huonokasvuisesta näytteestä sekä tehdyistä erilaisista solujen esikäsittelyn kokeiluista, ei yhdestä näytteestä saatu sopivaa solususpensiota monistettavaksi.

Viljelystä soluista suoritettiin laskennan jälkeen erilaisia laimennossarjoja, jotta saatiin kokeiltavaksi erilaisia solumääriä monistamiseen. Pääsääntöisesti pyrittiin mahdollisimman pieneen solumäärään, jotta vertailtavuus blastomeereillä monistamiseen säilyisi. Samasta näytteestä laimennettiin myös erivahvuisia solususpensioita valmistajan asettamien solumääräsuositusten rajojen sisällä. Samassa sarjassa monistettiin esimerkiksi samasta näytteestä laimennettuja noin 600, 1200 ja 1800 solun näytteitä. Solumäärien vaihtelevuudella ei todettu olevan vaikutusta lopputulokseen, monistustuotteen määrä pysyi samankaltaisena riippumatta lähtösolumäärästä.

MDA-pohjaisella Repli-g-kitillä monistetuilla näytteillä saanti oli monistuksen jälkeen noin 1700–2200 ng/μl näytteestä riippuen. Puhtausaste (absorbanssi 260/280) vaihteli 1,65–1,75 välillä. Puhtaan DNA:n 260/280-arvo on 1,8, joten monistustuote ei ole mitauksen mukaan aivan puhdasta. Kitin valmistajan antamaan saantitavoitteeseen (800 ng/μl) verrattuna saatiin korkeampi saanti. Tämä voi kuitenkin johtua monistusnäytteen jääneistä irrallisista nukleotideista, joita NanoDrop-laite mittaa DNA:n lisäksi. Viljelystä soluilla tehdyt monistukset kiteillä mitattiin ainoastaan NanoDrop-laitteella (Qubit®-laite ei ollut vielä toiminnassa).

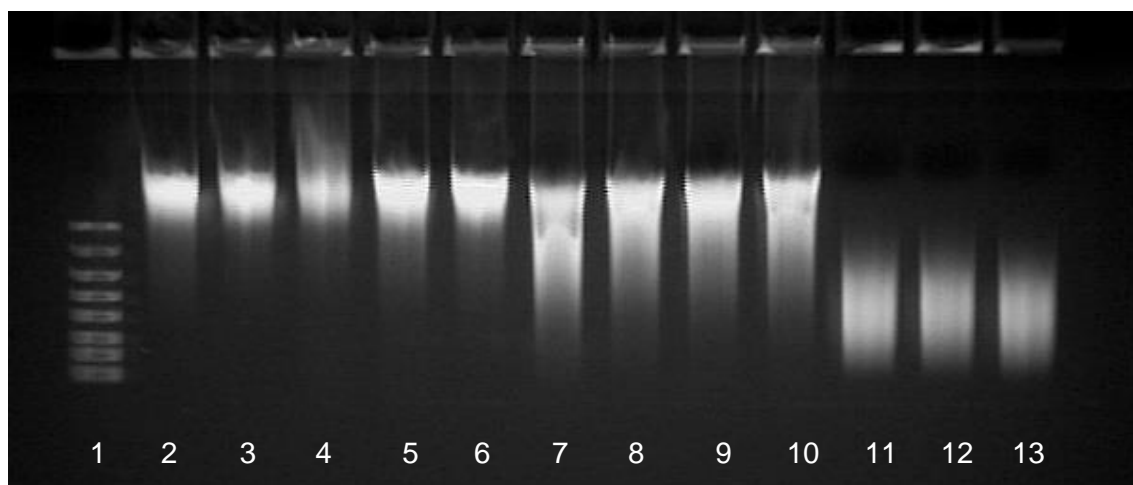
Repli-g-kitin valmistajan mukaan monistustuote ei vaadi puhdistusta, mutta puhdistus suoritettiin silti kokeilumielessä, koska tiedettiin NanoDrop-laitteen mittaavaan irrallisia nukleotideja. Puhdistus pylväiden läpi paransi DNA:n puhtausastetta, sen ollessa puhdistuksen jälkeen 1,76–1,84 näytteestä riippuen. Puhdistuksen yhteydessä menetettiin

kuitenkin aina hieman DNA-saantia, sen jäädessä 250–650 ng/μl välille. Tämä voi johtua sekä irrallisten nukleotidien poistumisesta, mutta myös muista syistä. Monistustuote vaatii puhdistuksen, kun pitoisuus mitataan NanoDrop-laitteella.

PCR-kitillä monistettaessa näytteiden saanti oli keskimäärin 895 ng/μl, puhtauden ollessa noin 1,72. Myös tämän näytteen monistustuotteen saanti mitattiin puhdistuksen jälkeen, jolloin saanti väheni noin 26 ng/μl:ssa. Puhtausaste ei olennaisesti parantunut puhdistuksesta huolimatta, puhdistuksen jälkeen arvo oli noin 1,73.

Viljellyillä soluilla monistettaessa käytettiin ainoastaan positiivia kontrolleja, joten tulosten perusteella ei voida tehdä lopullisia päätelmiä siitä sisältääkö monistustuote ainoastaan haluttua DNA:ta vai onko mukana kontaminantteja (PCR-pohjaisen kitin kohdalla ei kontrollinäytettä ollut lainkaan, koska tarvittava liuos kontrollinäytteen valmistamiseen ei ehtinyt saapua). Negatiivinen kontrolli otettiin mukaan testaukseen vasta alkionäytteiden kohdalla. Positiivisen kontrollin monistuttua samassa suhteessa näytteiden kanssa, voidaan todeta kuitenkin kitin monistuksen toimineen halutusti. Tästä saadaan alustavaa tietoa kiteille ominaisesta monistustehosta.

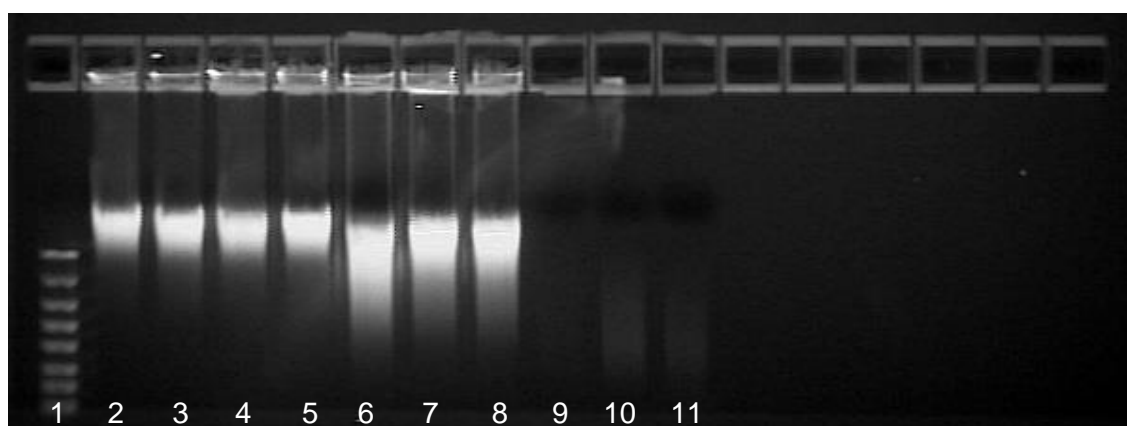
Monistustuote eroteltiin lisäksi agaroosigeelielektroforeesissa, jolloin voitiin analysoida monistustuotteen laatua. Alla olevien kuvien perusteella voidaan todeta, että monistustuote vastaa kitin antamaa lupaa DNA:n laadusta. Repli-g-kitillä monistettu DNA sisältää pidempiä fragmentteja verrattuna PCR-kitillä monistettuun DNA:han. Repli-g Midi ja Single Cell -kittien ero näkyy pienenä erona fragmenttijaksojen pituudessa Single Cell -kitin monistustuotteen fragmenttien ollessa kooltaan hieman pienempiä. Alla ensimmäisenä geelikuva puhdistamattomasta monistustuotteesta.



Kaivo 1	Kaivo 2	Kaivo 3	Kaivo 4	Kaivo 5	Kaivo 6	Kaivo 7	Kaivo 8	Kaivo 9	Kaivo 10	Kaivo 11	Kaivo 12	Kaivo 13
Marker	163 (Repli-g Midi)	Kontrolli (Repli-g Midi)	106 (Repli-g Midi)	122 (Repli-g Midi)	Kontrolli (Repli-g Midi)	106 (Repli-g Single Cell)	122 (Repli-g Single Cell)	163 (Repli-g Single Cell)	Kontrolli (Repli-g Single Cell)	106 (Single Cell WGA Kit)	122 (Single Cell WGA Kit)	163 (Single Cell WGA Kit)
TESTI 2 (MDA) ->			TESTI 3 (MDA) ->			TESTI 4 (MDA) ->			TESTI 5 (PCR) ->			

Kuvio 13. Viljellyt solut ennen puhdistusta.

Alla olevan kuvion (puhdistettu monistustuote) perusteella voidaan todeta, että puhdistus ei ole olennaisesti vaikuttanut kittien monistustuotteiden fragmenttikokoon. Kuten mittaustuloksista voitiin havaita, pieneni monistustuotteen DNA-pitoisuus puhdistuksen yhteydessä. Tämä näkyy erityisesti PCR-kitin monistustuotteen yhteydessä, jolloin DNA:n konsentraatio on alentunut niin paljon (26 ng/μl), ettei se enää näy geelielektroforeesissa.



Kaivo 1	Kaivo 2	Kaivo 3	Kaivo 4	Kaivo 5	Kaivo 6	Kaivo 7	Kaivo 8	Kaivo 9	Kaivo 10	Kaivo 11
Marker	163 (Repli-g Midi)	106 (Repli-g Midi)	122 (Repli-g Midi)	Kontrolli (Repli-g Midi)	106 (Repli-g Single Cell)	122 (Repli-g Single Cell)	163 (Repli-g Single Cell)	106 (Single Cell WGA Kit)	122 (Single Cell WGA Kit)	163 (Single Cell WGA Kit)
TESTI 2 (MDA) TESTI 3 (MDA) ->			TESTI 4 (MDA) ->			TESTI 5 (PCR) ->				

Kuvio 14. Viljellyt solut puhdistuksen jälkeen.

Viljellyillä soluilla suoritettu koko genomin monistaminen antoi suuntaa antavaa tietoa kittien toimivuudesta ja suorituskyvystä ennen siirtymistä blastomeerien monistamiseen. Tässä vaiheessa oletuksena voidaan pitää, että Repli-g-kitti tuottaa enemmän

DNA:ta verrattuna PCR-kitillä monistettuun DNA:han. Monistustuote poikkeaa myös laadultaan PCR-monistustuotteesta. Repli-g-kitillä monistetun DNA:n fragmenttikoko on suurempaa verrattuna PCR-tekniikalla monistettujen DNA:n fragmenttijaksojen kokoon.

7.2 Laboratoriotyövaihe 2 – alkiot

Blastomeerit saatiin laboratorioon valmiina sovitussa määrässä PBS-liuosta, joten viljeltyjen solujen kohdalla tehty työläs solujen käsittelyn alkuvaihe ennen monistusta jäi pois, ja voitiin siirtyä suoraan kittien testaamiseen. Alkioiden näytteitä monistettiin yhteensä 14, neljässä eri työvaiheessa, joissa kahdessa käytettiin MDA-pohjaista Repli-g Single Cell -kittiä ja kahdessa PCR-pohjaista Single Cell -kittiä. Ensimmäinen vaihe suoritettiin tuoreesta näytteestä heti biopsian jälkeen, loput pakastetuista ja sulatetuista näytteistä.

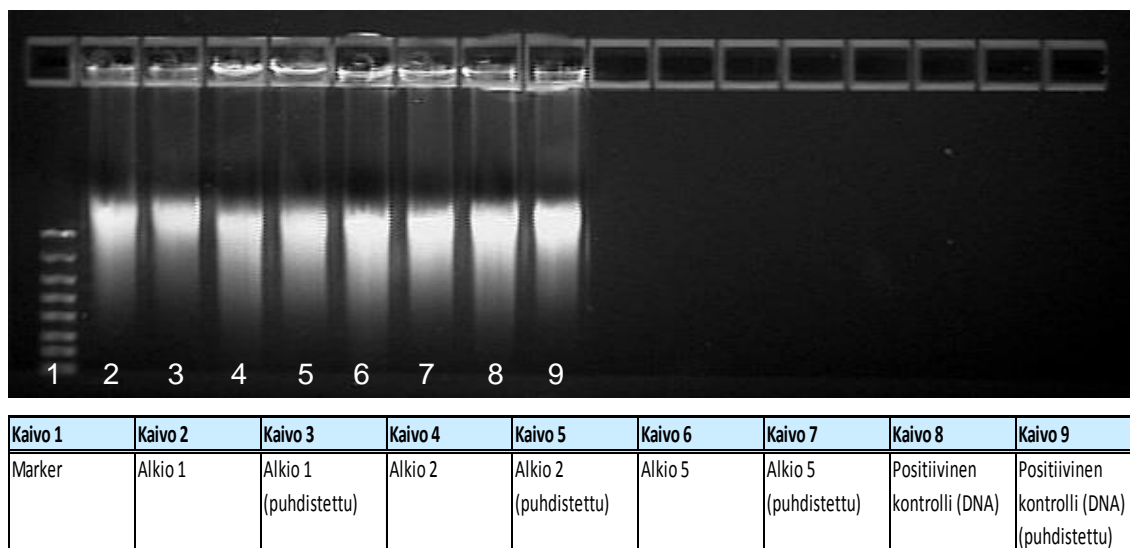
Kun kaikki blastomeerinäytteet oli monistettu ja monistustuote mitattu NanoDrop-laitteella, päätettiin tehdä koemittauksia osalle näytteistä myös Qubit®-laitteella. Qubit® oli juuri saapunut laboratorioon, muttei vielä vakituksessa käytössä. Tarkoitus oli tehdä mittaukset molemmilla laitteilla ennen ja jälkeen puhdistuksen kuten viljeltyjen solujen kohdalla, mutta puhdistuskitin loppuessa kesken ja uuden kitin saapumisen viivästyessä osa näytteistä jäi puhdistamatta. Edellisestä työvaiheesta poiketen, otettiin alkioiden kohdalla mukaan positiivisen kontrollin lisäksi myös negatiivinen kontrolli toisessa työvaiheessa.

Liitteestä kaksi (Koko genomin monistamisen tulokset – alkiot) selviää kittien testauksen tulokset alkioiden blastomeereistä työvaiheittain 1–4.

NanoDropilla mitattaessa MDA-pohjainen Repli-g-kitti antaa alkioiden kohdalla viljeltyjen solujen kaltaisesti suurempia konsentraatioita kuin PCR-pohjainen kitti. Repli-g:llä monistettaessa saanti alkioiden kohdalla on noin 2000–2800 ng/μl (tavoitesaanti kitillä 800 ng/μl). Konsentraatiot ovat samansuuntaiset kuin viljellyillä soluilla. Puhdistuksen jälkeen saanti on pienentynyt, sen ollessa 350–750 ng/μl. Puhtausaste vaihteli ennen puhdistamista 1,70–1,78 välillä, puhdistuksen jälkeen se oli 1,76–1,82 välillä. Viljeltyjen solujen tapaan puhdistus siis paransi hieman puhtausastetta, mutta hävitti samalla saadun DNA:n määrää.

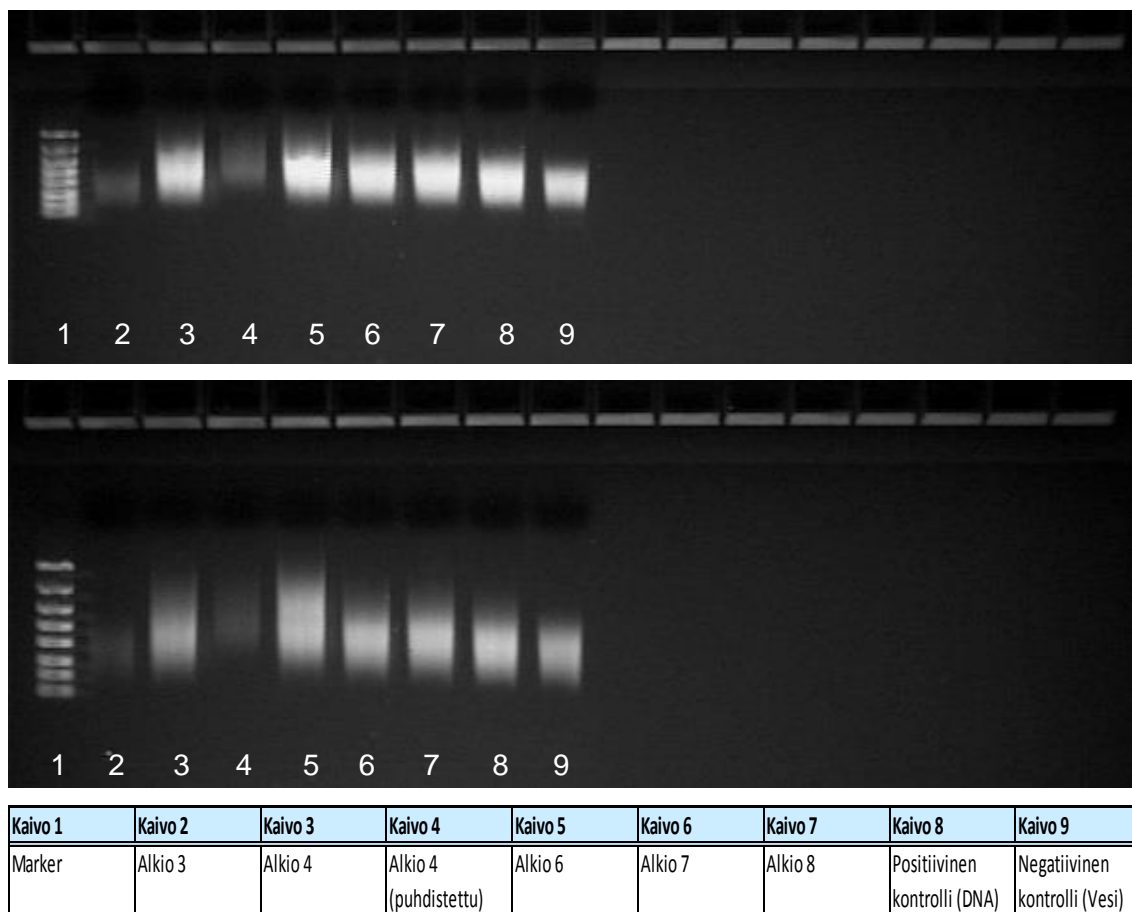
PCR-tekniikkaa käyttävällä Single Cell WGA -kitillä monistettaessa saanti oli noin 830–930ng/μl (tavoitesaanti kitillä 40 ng/μl). Tällä kitillä monistetuista näytteistä puhdistettiin ainoastaan yksi. Puhdistuksen jälkeen saanti oli vähentynyt 20 ng/μl, joka noudatti samaa linjaa viljeltyjen solujen kohdalla mitattujen arvojen kanssa. Ennen puhdistusta puhtaus oli noin 1,74 ja puhdistuksen jälkeen noin 1,83. Positiivinen kontrolli noudatti samaa linjaa muiden monistettujen näytteiden kohdalla molemmissa kiteissä.

Alla on ensimmäisen vaiheen monistuksen (MDA) näytteet kuvattuna geelielektroforeesin jälkeen. Osa näytteistä on puhdistettu, osa ei. Tässä sarjassa ei siis ollut vielä mukana negatiivista kontrollia. Kuviosta voidaan todeta, että näytteiden laatu on verrattain samanlainen riippumatta monistustuotteen puhdistuksesta.



Kuvio 15. Alkiot testi 1 (Repli-g Single Cell, MDA)

Toisen monistusvaiheen kohdalla otettiin mukaan myös negatiivinen kontrolli (RNAasi-vapaa vesi), jolloin huomattiin että myös se oli monistunut (katso alla oleva kuvio). NanoDropilla mitattaessa negatiivinen kontrollinäyte antoi samansuuntaisia arvoja kuin muutkin näytteet. Mittaustulos saattoi johtua NanoDropin mittaamista vapaista nukleotideista tai mahdollisesta kontaminaatiosta näytteessä. Sarja eroteltiin geelielektroforeesilla, jolloin huomattiin, että myös negatiivisen kontrollin kaivossa (viimeinen näkyvä kaivo jossa monistustuotetta) on DNA:ta. Tästä voidaan vetää se johtopäätös, että tässä sarjassa on kontaminaatio.



Kuvio 16. Alkiot testi 2 (Single Cell WGA Kit/PCR, kuvat eri kohdista geelielektroforeesia).

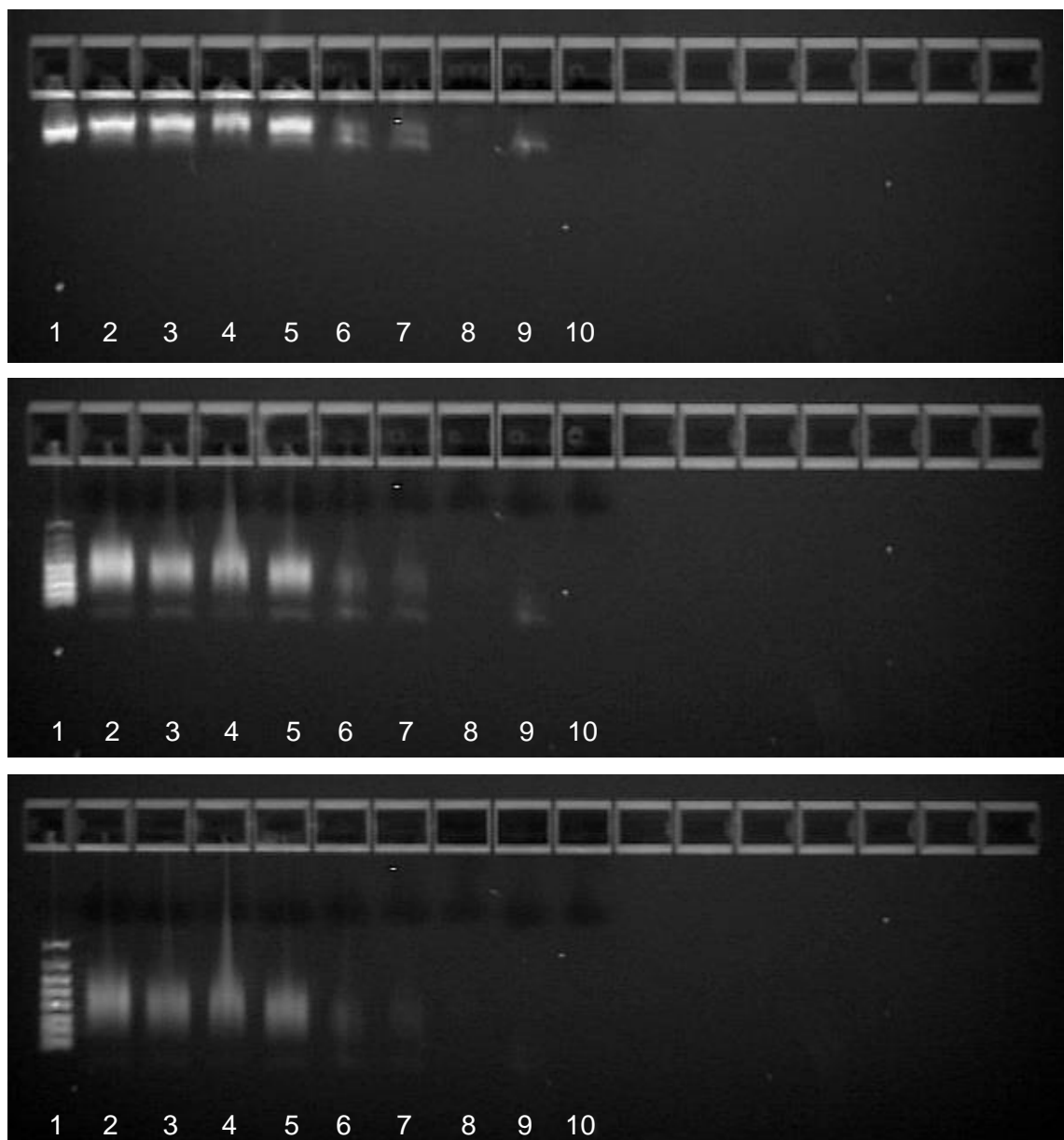
Tässä vaiheessa päätettiin ottaa mukaan seuraaviin sarjoihin negatiivisen vesikontrollin lisäksi myös toinen negatiivinen kontrolli. Toisena negatiivisena kontrollina päätettiin käyttää liuosta, johon solut ennen monistamisen suorittamista laimennetaan. MDA-pohjaisen kitin kohdalla tämä tarkoittaa PBS-liuosta, PCR-pohjaisen kitin kohdalla kitin mukana tullutta laimennuspuskuria. Lisäksi päätettiin mitata NanoDropilla molempien kittien kohdalla myös pelkkä reaktiomix ilman lisättyä DNA:ta ja monistusprosessia.

Tuloksista selvisi, että molemmat negatiiviset kontrollit (vesi ja buffer) olivat monistuneet, tulokseksi saatiin samansuuntaisia tuloksia kuin muilla näytteillä ja positiivisella kontrollilla. Mitattaessa pelkkää reaktiomixiä saatiin tästäkin tulokseksi samansuuntaisia tuloksia kuin muilla sarjassa mukana olleilla näytteillä, vaikkei reaktiomix ollut käynyt läpi lainkaan PCR-monistusprosessia.

Monistustuotteista puhdistettiin negatiivisista kontrolleista vesi sekä pelkkä reaktiomix. Nyt tulokset olivat lähellä nollaa, vesikontrollin tulos oli NanoDropilla mitattaessa 1,83 ng/μl ja reaktiomix 0,43 ng/μl. Tästä voidaan päätellä, että puhdistuksessa saatiin pois

ylimääräiset irralliset nukleotodit, jotka häiritsevät mittausta NanoDropilla. Myös pelkässä reaktiomixissä voidaan olettaa olevan mittausta NanoDropilla häiritseviä ainesosia, jotka saatiin pois puhdistuksen yhteydessä. Voidaan olettaa, että sarjassa ei siis olisi kontaminaatiota.

Alla olevasta sarjan geelielektroforeesikuvasta voidaan nähdä, että monistustuotteen DNA näkyy parhaiten ensimmäisen viiden kaivon (marker + 4 kaivoa) kohdalla, myös viimeisen, positiivisen kontrollin (kaivo 5) kohdalla. Loput kaivot ovat negatiivisia kontroleja tai pelkkää reaktiomixiä. Myös tästä voimme päätellä, ettei DNA:ta ole muissa kaivoissa kuin alkionäytteissä ja positiivisessa kontrollissa.



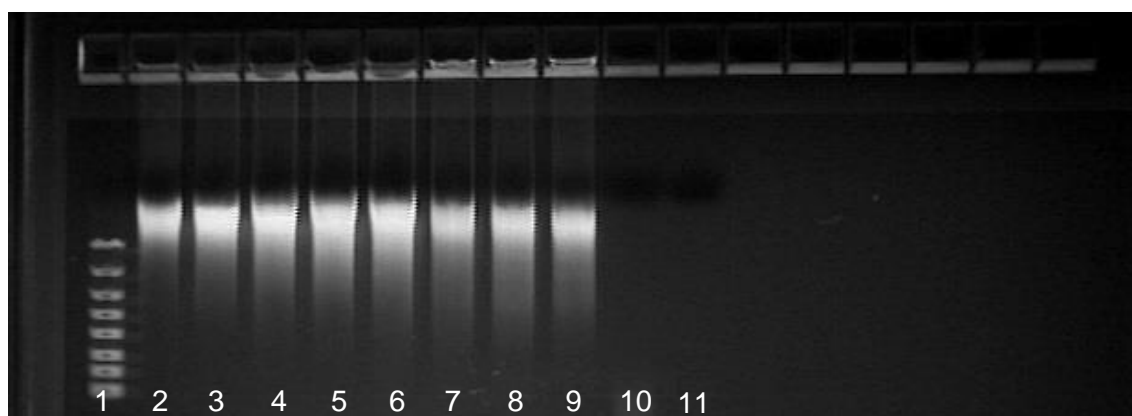
Kaivo 1	Kaivo 2	Kaivo 3	Kaivo 4	Kaivo 5	Kaivo 6	Kaivo 7	Kaivo 8	Kaivo 9	Kaivo 10
Marker	Alkio 13	Alkio 14	Alkio 16	Positiivinen kontrolli (DNA)	Negatiivinen kontrolli (buffer)	Negatiivinen kontrolli (vesi)	Negatiivinen kontrolli (vesi) (puhdistettu)	Reaktiomix	Reaktiomix (puhdistettu)

Kuvio 17. Alkiot testi 3 (Single Cell WGA Kit/PCR, kuvat eri kohdista geelielektroforeesia).

Viimeisessä, neljännessä sarjassa blastomeerien DNA monistettiin MDA-pohjaisella Repli-g Single Cell -kitillä. Edellisten sarjojen tapaan myös tässä molemmat negatiiviset kontrollit (PBS ja vesi) antoivat positiivisen tuloksen näytteiden tapaan. Myös pelkkä reaktiomix joka ei käynyt monistusprosessia läpi, antoi samansuuntaiset tulokset.

Yksi näytteistä, vesikontrolli ja pelkkä reaktiomix puhdistettiin ja mitattiin uudelleen NanoDropilla. Alkionäyte näytti aiempien mittausten tapaan niin kutsuttua normaali konsentraation häviämistä (2004 ng/μl -> 554 ng/μl), puhtausaste oli parantunut hieman (1,75 -> 1,76). Nollanäytteen kohdalla ei mitaus NanoDropilla näytä edelleenkään nollaa (253 ng/μl), jolloin voidaan olettaa, että sarjassa on kontaminaatio. Myös reaktiomix, joka ei ole käynyt läpi monistusprosessia näyttää ennen puhdistusta korkeaa tulosta (3114 ng/μl). Mahdolliseen kontaminaatioon viittaa myös puhdistetun reaktiomixin tulos, joka on nyt lähellä nollaa (4,59 ng/μl).

Myös alla olevasta geelielektroforeesiajon kuvasta voidaan olettaa, että sarjassa on mahdollinen kontaminaatio, alkionäytteiden lisäksi negatiivisten näytteiden (vesi ja PBS) kaivossa näkyy monistustuotetta riippumatta siitä, onko monistustuote puhdistettu vai ei. Pelkkää reaktiomixiä sisältävässä kaivossa ei taas näy monistustuotetta lainkaan (kaivot 10 ja 11).



Kaivo 1	Kaivo 2	Kaivo 3	Kaivo 4	Kaivo 5	Kaivo 6	Kaivo 7	Kaivo 8	Kaivo 9	Kaivo 10	Kaivo 11
Marker	Alkio 9	Alkio 9 (puhdistettu)	Alkio 11	Alkio 15	Positiivinen kontrolli (DNA)	Negatiivinen kontrolli (PBS)	Negatiivinen kontrolli (vesi)	Negatiivinen kontrolli (vesi) (puhdistettu)	Reaktiomix	Reaktiomix (puhdistettu)

Kuvio 18. Alkiot testi 4 (Repli-g Single Cell/MDA).

Alkionäytteiden kohdalla monistustulokset noudattivat viljeltyjen solujen kanssa samaa linjaa. Tulosten perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä kittien eroavaisuuksia. Kontaminaatio voidaan varmasti sanoa olevan ainakin yhdessä sarjoista.

7.3 Tulosten vertailu eri mittalaitteilla

Laboratoriotyövaiheen lopussa haluttiin NanoDropilla suoritettuja mittauksia vertailla myös Qubit®-mittauslaitteen antamiin tuloksiin. Monistetuista alkionäytteistä osa mitattiin siis myös Qubit®:lla, joka perustuu erilaiseen mittausmenetelmään kuin NanoDrop. Tiedettiin, että Qubit® mittaa matalampia pitoisuuksia kuin NanoDrop, joten korkeita konsentraatioita ei sillä pystyittäisi mittaamaan ilman laimennossarjan tekoa. Tiedettiin myös, että Qubit®:lla ei voida mitata lainkaan puhtausastetta. Mittaus haluttiin kuitenkin suorittaa, koska sen tiedettiin mittaavan pelkästään DNA:ta, eikä se vaadi puhdistusta ennen monistustuotteen mittaamista. Qubit®:n mittaustulosta eivät pitäisi häiritä irralliset nukleotidit eivätkä RNA kuten NanoDropin mittauksessa.

Tuloksia tarkasteltaessa (liite 2. Koko genomin monistamisen tulokset – alkiot.) voidaan todeta, että Qubit® mittaa luotettavimmin alhaisia konsentraatioita, kuten PCR-tekniikalla monistetettua koko genomin DNA:ta. Kun mitataan alhaisia DNA-konsentraatioita, NanoDropilla saadut luvut ovat epäluotettavia, sillä niistä saadaan yleensä suurempi konsentraatio kuin mitä näytteessä todennäköisesti on. Esimerkiksi blastomeerien sarjassa 2. NanoDropilla saadut tulokset (noin 880 ng/μl) olivat Qubit®:lla mitattaessa noin 42 ng/μl, mikä vastaa hyvin kitin valmistajan antamaa tavoitetsaantia (40 ng/μl). Korkeita konsentraatioita mitattaessa (MDA-monistustuotteet) Qubit® antoi useasti tulokseksi ”sample too high” tai noin 100 ng/μl luokkaa olevia tuloksia (kitin saantitavoite valmistajan mukaan 800 ng/μl). Tulokset ovat siis luotettavampia alhaisissa konsentraatioissa. Korkeiden konsentraatioiden mittaaminen on Qubit®-laitteella kuitenkin mahdollista käyttäen hyväksi laimennossarjoja. Qubit® antoi nollanäytteistä lähellä nollaa olevia tuloksia jo ennen monistustuotteen puhdistamista, mikä todentaa sen, että laite mittaa ainoastaan DNA:n määrää eikä vaadi välttämättä

puhdistamista ennen mittausta. Qubit®-laitetta käytettäessä on otettava huomioon, ettei laite mittaa lainkaan monistustuotteen absorbanssia.

8 Pohdinta

Koko genomin monistamiseen tarkoitettujen kittien käyttöönotto ja monistustuotteen analysointi NGS ja/tai molekyylikaryotyypitys -menetelmillä alkiodiagnostiikan yhteydessä on tulevaisuudessa hyvin todennäköistä. Prosessi menetelmien kehittämiseksi on kuitenkin pitkä ja vaatii toteutuakseen monia vaiheita ja käytettyjä työtunteja. Opinnäytetyö toimi prosessissa aloittavana tekijänä, ollessaan vain pieni osa prosessia. Opinnäytetyön laboratoriotyöosuuteen käytetty aika oli lyhyt verrattuna koko prosessin vaatimaan aikaan nähden, joten lopullista ratkaisua kittien käyttöönotosta on mahdollista vielä tehdä. Opinnäytetyön pohjalta voidaan kuitenkin tehdä alustavia päätelmiä kittien toimivuudesta ja eroista, joiden pohjalta prosessia voidaan jatkaa myöhemmin.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, voidaanko tutkimukseen valituilla reagenssikiteillä suorittaa koko genomin monistaminen onnistuneesti, saadaanko DNA:ta monistettua tarpeeksi jatkotutkimuksia varten ja täyttääkö se konsentraatio- ja puhtausvaatimukset sekä sitä, kumpi kiteistä ja testattavista menetelmistä sopii tarkoitukseen paremmin, PCR vai MDA -pohjainen menetelmä?

8.1 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Jos tarkastellaan opinnäytetyön laboratorio-osuuden tuloksia ensin ottamatta kantaa mahdolliseen kontaminaatioon monistusprosessissa, voidaan tulosten pohjalta todeta, että koko genomin monistaminen opinnäytetyöhön valituilla kiteillä onnistui tavoitellusti. Molemmilla kiteillä onnistuttiin monistamaan DNA:ta kittien valmistajan lupaamien odotusarvojen suuntaisesti. Tulokset ovat samansuuntaiset sekä viljeltyjen solujen että alkion blastomeerien monistuksesta saaduissa tuloksissa. Jopa näytettä, jossa tiedettiin olevan vain yksi solu, onnistuttiin monistamaan.

Jatkotutkimuksia varten tarvittava DNA-määrä saavutettiin monistamisen avulla, joten voidaan todeta monistustuotteen DNA:n määrän olevan riittävä. Monistustuotteen konsentraatio oli lähellä valmistajan lupaamia tavoitearvoja. Monistetun DNA:n puhtausaste oli lähellä 1,8 arvoa. Absorbanssiarvo parani puhdistuksen jälkeen, mutta jo ennen

puhdistusta DNA:n puhtaus saavuttaa useammassa tapauksessa, etenkin MDA-pohjaisen kitin kohdalla, riittävän saannon jatkotutkimuksiin. DNA:n laatua arvioitiin agarosigeelielektroforeesin perusteella, jonka avulla voidaan tehdä päätelmiä kittien monistuskyvyn eroavaisuuksista sekä monistustuotteen fragmenttien pituudesta. Tarkempaa DNA:n laatua on mahdotonta arvioida ennen näytteille suoritettavien jatkotutkimuksien, esimerkiksi molekyylikaryotyypitys-tutkimuksen suorittamista. Alla olevassa taulukossa on tarkemmin eroteltuna saadut konsentraatio- ja puhtausastetulokset menetelmittain.

Taulukko 2. Konsentraatio- ja puhtausaste-erot menetelmittain ennen puhdistusta (suluissa arvot puhdistuksen jälkeen)

	VILJELLYT SOLUT		ALKIOT	
	Konsentraatio	Puhtausaste	Konsentraatio	Puhtausaste
MDA	1700–2200 ng/μl (250–650 ng/μl)	1,65–1,75 (1,76–1,84)	2000–2800 ng/μl (350–750 ng/μl)	1,70–1,78 (1,76–1,82)
PCR	noin 895 ng/μl (26 ng/μl)	1,72 (1,73)	830–930 ng/μl (20 ng/μl)	1,74 (1,83)

Kittien testausten tuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta kittien toimintaperiaatteessa ja tuloksissa olevan selkeitä eroja. Kuten kirjallisuus jo osoitti, tuottaa MDA-tekniikkaa käyttävä koko genomien monistaminen suurempikokoista monistustuotetta kuin PCR-pohjainen monistaminen. Suuremman fragmenttikoon lisäksi se tuottaa sekä pitoisuudeltaan että puhtausasteeltaan parempaa monistustuotetta kuin PCR-menetelmällä monistettu DNA. Konsentraatiomäärään vaikutti monistustuotteen mahdollinen puhdistaminen. Absorbanssin avulla mitattu puhtausaste (260/280) on mahdollista saada lähemmäksi tavoitearvoa (1,8) puhdistamalla saatu monistustuote puhdistuspylväitä apuna käyttäen. Tällöin kuitenkin menetetään olennaisesti DNA-saantia. Tämä korostuu erityisesti PCR-pohjaisen kitin kohdalla, jolloin menetetään suurin osa monistustuotteen konsentraatiosta.

Tarkasteltaessa tuloksia tulee ottaa huomioon, että monistamista ei pystytty suorittamaan täysin ilman kontaminaatiota. Näin ollen ei laboratoriotyövaiheen tuloksiin voida suhtautua varauksettomasti. Monistetun DNA:n mukana on osassa sarjoista ollut mah-

dollisesti mukana myös muualta kuin näytteestä peräisin olevaa DNA:ta. Kuten kirjallisuuden perusteella todettiin, koko genomin monistaminen tulee suorittaa äärimmäistä aseptiikkaa ja puhdastilatyöskentelyn ohjeita noudattaen. Koko genomin monistaminen muutamista soluista on erityisen altis kontaminaatiolle.

Koko genomin monistaminen suoritettiin opinnäytetyön yhteydessä noudattaen huolellista, aseptista työtapaa, käyttäen työhön varattuja työvälineitä sekä puhdistuen tilat ja työvälineet olosuhteet huomioon ottaen mahdollisimman hyvin. Käytössä oli esimerkiksi laminaarivirtauskaappi, joka puhdistettiin ja UV-valotettiin ennen monistamista. Myös työskentelyvälineet sekä -tavat olivat ohjeiden mukaiset. Genetiikan laboratorion tämänhetkiset tilat, jossa koko genomin monistaminen nyt suoritettiin, eivät kuitenkaan täytä täysin puhtausvaatimuksia, joita koko genomin monistaminen edellyttää. Käytävissä ei ole työtilaa, joka saataisiin puhdistettua kokonaan vaatimusten mukaisesti. Myös muut samaan aikaan suoritettavat työtoiminnot samassa tilassa aiheuttivat haasteen puhtauden ylläpidolle. Näin ollen oli odotettavissa, että kontaminaatiota syntyisi.

Kontaminaation lisäksi tulee tulosten tarkastelussa ottaa huomioon myös laite, jolla tulos mitataan sekä monistustuotteen mahdollinen puhdistamisen tarve. NanoDrop-laitte mittaa monistustuotteessa olevia irrallisia nukleotideja sekä RNA:ta, jotka häiritsevät mittausta. Nämä voidaan poistaa puhdistuksen avulla, samalla kuitenkin menetettään DNA:ta myös muista syistä. Qubit®-laitteella mitattaessa ei puhdistusta välttämättä tarvita. PCR-tekniikkaan perustuvan kitin valmistaja suosittelee puhdistusta ennen monistustuotteen jatkoanalysointia. MDA-pohjaisen kitin valmistajan ohjeiden mukaan puhdistaminen ei ole välttämätöntä, mutta myös tässä tapauksessa puhdistaminen paransi hieman 260/280-arvoa. Laitteilla on myös mitta-alue ja -menetelmäeroja, joka täytyy ottaa huomioon mitattaessa. Qubit®-laitteella pystytään luotettavammin mittaamaan alhaisia konsentraatioita. Korkean konsentraation mittaaminen Qubit®-laitteella edellyttää monistustuotteen laimentamista ennen mittausta. Qubit® mittaa ainoastaan näytteen DNA:ta, mutta sillä ei voida mitata lainkaan näytteen absorbanssia. Molemmilla laitteilla on siis hyvät ja huonot puolensa, jotka täytyy ottaa huomioon suunniteltaessa monistustuotteen mittausta jatkossa. Mahdollisesti laitteita voidaan ja tulee käyttää yhdessä luotettavan tuloksen saamiseksi.

Suoritettaessa monistusta PCR-pohjaisella kitillä huomattiin, että käytössä ollut PCR-laitte oli suunniteltu näytteille, joiden lopullinen maximitilavuus on 50 µl. Tämän kitin kohdalla näytteen lopullinen tilavuus ennen viimeistä PCR-sykliä oli 75 µl. Huolimatta

siitä, että laitteen asetuksia ei pystytty muuttamaan sopivaksi 75 µl:n tilavuudelle, monistus suoritettiin. Tuloksia tarkasteltaessa on vaikeaa sanoa, vaikuttiko asia lopputulokseen.

Huolimatta mahdollisesta kontaminaatiosta, voidaan tulosten perusteella kuitenkin vetää johtopäätöksiä kittien eroista sekä monistuskyvystä. Lopputuloksena voidaan todeta, että alkiodiagnostiikan yhteydessä kiteistä tarkoitukseen sopii parhaiten MDA-tekniikkaa soveltavat Repli-g-kitit. Alkiodiagnostiikkaan suunniteltu Single Cell -kitti toimii koko genomin monistuksessa hyvin, mutta myös Repli-g Midi -kitillä saatiin hyviä tuloksia. Huolimatta valmistajan asettamasta yli 600 solun vähimmäissolumäärästä, ei Repli-g Midi -kitin käyttö siis ole poissuljettu vaihtoehto mietittäessä kitin toimivuutta alkiodiagnostiikassa. Kuten kirjallisuuden perusteella todettiin, on kitti käytössä maailmalla myös alkiodiagnostiikan yhteydessä sen toimintaa hieman muunneltuna. Myös kirjallisuuden pohjalta voidaan todeta MDA-menetelmään pohjautuvien koko genomin monistamiseen tarkoitettujen kittien soveltuvan genetiikan laboratorion tavoitteisiin paremmin, jos tarkoituksena on siirtyä molekyylikaryotyypityksen lisäksi NGS-menetelmän käyttöön jatkoanalysoinnissa. PCR-pohjaista monistusmenetelmää ei voida käyttää NGS-analysoinnin yhteydessä.

8.2 Luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyön yhteydessä analysoitiin iho-, lapsivesi- ja istukkanäytteitä sekä alkiodien soluja. Niin kuin potilasnäytteiden kohdalla yleensäkin, on opinnäytetyön näytteiden kohdalla työskenneltävä noudattaen huolellista, luotettavaa ja eettistä työtapaa. Näytteet valikoitiin testaukseen huolella ja niitä käsiteltiin asianmukaisesti ottaen huomioon luotettava ja eettinen työskentelytapa. Näytteitä käsiteltiin numeroilla eikä näytteitä yhdistetty potilastietoihin missään vaiheessa. Testauksen yhteydessä käytettiin kudoksenäytteiden kohdalla ainoastaan poistoon meneviä, jo analysoituja soluja ja solujen käyttöön oli saatu lupa Genetiikan yksikköryhmän päälliköltä. Myös IVF-laboratoriosta saattuihin alkioihin oli IVF-laboratorio hankkinut luvat käyttää niitä menetelmien kehitystoiminnassa.

Johtuen rajallisesta ajasta, kittien ja reagenssien korkeasta hinnasta sekä näytemateriaalin saatavuudesta (alkiot), jouduttiin näytemäärää rajaamaan. Vaikka testaukseen valittujen näytteiden näytemäärä oli melko pieni, katsotaan sen kuitenkin olleen riittävä arvioitaessa kittien toimivuutta ja keskinäisiä eroja.

Opinnäytetyön prosessin edetessä jouduttiin tekemään olosuhteiden pakosta erinäisiä ratkaisuja, jotka vaikuttivat lopputulokseen. Muun muassa kittien toimituksessa, laboratoriotyövaiheeseen tarvittavien liuoksien sekä esimerkiksi puhdistuskitin toimituksessa oli hankaluuksia, joten kesken prosessia jouduttiin välillä suunnitelmaa muuttamaan sekä tekemään uusia päätöksiä poiketen alkuperäisistä suunnitelmista. Näin ollen työn luotettavuuden tarkastelussa tulee ottaa huomioon myös esimerkiksi se, ettei aivan kaikkia näytteitä ole mitattu sekä ennen että jälkeen puhdistuksen puhdistuskitin loppuessa kesken. Alkuperäisestä suunnitelmasta poiketen tehtiin laboratoriotyöosuuden lopussa mittauksia myös toisella, juuri laboratorioon saapuneella laitteella josta ei vielä ole suurta kokemusta. Laite on laboratoriossa uusi, eikä sitä ole aiemmin testattu näytteillä käyttöönottotarkastusta lukuun ottamatta. Ajan puutteen vuoksi ei kaikkia näytteitä ole mitattu molemmilla laitteilla.

Myös nollanäytteen puuttuminen osan sarjojen kohdalla heikentää tuloksien arvioinnin luotettavuutta. Viljellyillä soluilla monistettaessa käytettiin ainoastaan positiivisia kontroleja, joten tulosten perusteella ei voida tehdä lopullisia päätelmiä siitä sisältääkö monistustuote ainoastaan haluttua DNA:ta vai onko mukana kontaminantteja. Negatiivinen kontrolli otettiin mukaan testaukseen vasta alkionäytteiden kohdalla. Edellä mainittujen seikkojen vuoksi ei esimerkiksi mahdollista kontaminaatiota pystytä aivan varmasti toteamaan kaikkien sarjojen kohdalla.

Opinnäytetyön laboratoriotyöosuus suoritettiin suunnitelman mukaisesti noudattaen tarkoin kittien valmistajan ohjeita. Työn edetessä käytettiin apuna kokeneempien työntekijöiden sekä geneetikon tietämystä. Työn vaiheet kirjattiin tarkasti ylös koko prosessin ajan ja työmenetelmiä muutettiin tarvittaessa. Luotettavuutta arvioitaessa täytyy kuitenkin ottaa huomioon opinnäytetyön tekijän kokemattomuus DNA-työskentelystä. Huolimatta huolellisesta työskentelytavasta ja aiemmasta työskentelyhistoriasta laboratoriossa, ei kokemus yllä vielä muiden työntekijöiden tasolle. Tuloksia arvioitaessa täytyy ottaa huomioon mahdolliset pipetointivirheet sekä mahdollisesta inhimillisestä erehdyksestä johtuvat virheet. Työn edetessä ei huomattu tapahtuvan virheitä työskentelytavassa, joten oletettavasti näillä seikoilla ei ollut vaikutusta lopputulokseen.

8.3 Ehdotuksia jatkotutkimukseksi

Alkiodiagnostiikan menetelmien kehittämisprojektia tulee jatkaa laboratorion toimesta opinnäytetyön toteutusosan jälkeen. Lopullisten tulosten selvittäminen vaati useita koko genomin monistamisen toistokertoja sekä laajempia kittivertailuja.

Opinnäytetyö antoi kuitenkin alustavia tietoja testaukseen valittujen kittien eroavaisuuksista, joita voidaan tarkentaa kehittämisprojektin edetessä. Opinnäytetyön perusteella MDA-pohjaiset Repli-g-kitit tuottivat parhaimman tuloksen koko genomin monistamisessa alkiodiagnostiikan yhteydessä. Kittien tarkempaa vertailua voitaisiin jatkaa laajentamalla näytemäärää niin alkion kuin muidenkin solujen osalta. Näin voitaisiin selvittää tarkemmin mahdollisuuksia myös Midi-kitin käyttöön alkiodiagnostiikan yhteydessä.

Tulevaisuudessa ajankohtaista olisi opinnäytetyön yhteydessä monistettujen iho-, lapsivesi- ja istukkanäytteiden analysointi mahdollisuuksien mukaan joko molekyylikaryotyypityksen tai NGS-menetelmän avulla. Näytteet valikoitiin tutkimukseen aiemman tiedetyn poikkeavuuden mukaan, joten monistettujen näytteiden uudelleen analysointi esimerkiksi molekyylikaryotyypityksellä antaisi lisäinformaatiota monistuksen laadusta ja virheettömyydestä.

Jatkotutkimuksia suoritettaessa olisi tärkeää kiinnittää huomiota aseptiikkaan esimerkiksi työtilojen osalta selvittämällä mahdollisuutta muuttaa laboratorion tiloja paremmin koko genomin monistamiseen soveltuviksi. Näin voitaisiin jatkossa vähentää mahdollista kontaminaatoriskiä ja sen osalta helpottaa tuloksien tarkastelua.

Lähteet

Aittomäki, Kristiina – Hovatta, Outi 2006. Lisääntymisgenetiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.) 2006: Perinnöllisyyslääketiede. 206–218. Helsinki: Duodecim.

Alitalo, Tiina – Hyden-Granskog, Christel – Piippo, Kirsi – Salonen, Tarja – Sirkkanen, Noora – von Koskull, Harriet 2007. Experiences from FISH and PCR based preimplantation genetic diagnoses performed for 29 families. European Society of Human Genetics (ESHG) abstract. Nizza.

Alitalo, Tiina 2009. Geneetikko. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Miten alkiodiagnostiikka (PGD) toteutetaan – Näkökulmia laboratoriodiagnostiikan kannalta. Kirjallinen tiedonanto (powerpoint-esityksen muodossa) 17.9.2013.

Alitalo, Tiina 2013a. Geneetikko. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 17.9.2013.

Alitalo, Tiina 2013b. Geneetikko. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 2.12.2013.

Alitalo, Tiina 2014a. Geneetikko. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 22.1.2014.

Alitalo, Tiina 2014b. Geneetikko. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 7.2.2014.

Alitalo, Tiina 2014c. Geneetikko. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 14.3.2014.

Arneson, Nona – Hughes, Simon – Houlston, Richard – Done, Susan 2008. Whole-Genome Amplification by Improved Primer Extension Preamplification PCR (I-PEP-PCR). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol 3, Issue 1, January.

Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.) 2006. Perinnöllisyyslääketie-

de. Sanasto 351–358. Helsinki: Duodecim.

Freshney, R. Ian 2005. Culture of animal cells. A manual on basic technique. Fifth edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Frilander, Mikko 2006. DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.) 2006: Perinnöllisyyslääketiede. 14–30. Helsinki: Duodecim.

Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2009. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOYpro Oy.

Hughes, Simon – Arneson, Nona – Done, Susan – Squire, Jeremy 2005. The use of whole genome amplification in the study of human disease. Progress in Biophysics & Molecular Biology 88 (2005), 173–189.

HUSLAB Genetiikan laboratorio 2014. Esimerkkikuva FISH-analyysistä genetiikan laboratoriosta.

Illumina 2013. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Verkkodokumentti.

<http://res.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf>. Luettu 20.12.2013.

Keer, Jacquie T. – Birch, Lyndsey 2008. Essentials of Nucleic Acid Analysis. A Robust Approach. UK: RSC Publishing.

Klug, William S. – Cummings, Michael R. – Spencer, Charlotte A. – Palladino, Michael A. 2012. Concepts of Genetics. Tenth Edition. California: Pearson Education, Inc.

Knuutila, Sakari 2012a. Molekyyli-sytogenetiikka eli in situ -hybridisaatiomenetelmät. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): Terveysportti. Duodecim oppikirjat. <<http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti>>. Artikkelin tunnus: pat00760 (025.084). Luettu 23.12.2013.

Knuutila, Sakari 2012b. Fluoresenssi in situ -hybridisaatio. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): Terveysportti. Duodecim oppikirjat.

<<http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti>>. Artikkelin tunnus: pat00761 (025.086). Luettu 23.12.2013.

Knuutila, Sakari 2012c. Plymeraasiketjureaktio (PCR). Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): Terveysportti. Duodecim oppikirjat.

<<http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti>>. Artikkelin tunnus: pat00764 (025.092). Luettu 23.12.2013.

Knuutila, Sakari 2012d. Vertaileva genominen hybridisaatio (VGH). Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): Terveysportti. Duodecim oppikirjat.

<<http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti>>. Artikkelin tunnus: pat00762 (025.088). Luettu 23.12.2013.

Knuutila, Sakari 2012e. DNA-sirumenetelmät. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla sähköisesti (käytettävissä tunnuksilla): Terveysportti. Duodecim oppikirjat.

<<http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti>>. Artikkelin tunnus: pat00766 (025.096). Luettu 23.12.2013.

Lehtonen, Lasse (toim.) 2006. Bio-oikeus lääketieteessä. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Lähdetie, Jaana – Horell-Kuitunen, Nina 2001. Alkiodiagnostiikka. Duodecim 117: 2257–2263.

Moore, Ben 2014. Cost of sequencing a human-sized genome between September 2001 and April 2013 as estimated by the NHGRI. Creative commons search. File: Historic cost of sequencing a human genome.svg. Verkkodokumentti.
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Historic_cost_of_sequencing_a_human_genome.svg>
. Luettu 2.3.2014.

NanoDrop 1000 Spectrophotometer 2008. V3.7 User's manual. Thermo Scientific. Verkkodokumentti. <<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>>. Luettu 26.2.2014.

National Genome Project 2013. Verkkodokumentti.
<http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml>. Luettu 1.1.2014.
New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014a: Tuotetiedot. Verkkodokumentti.
<<https://www.neb.com/products/e2620-single-cell-wga-kit>>. Luettu 2.2.2014.

New England BioLabs Single Cell WGA Kit 2014b. Ohjekirja. Ladattavissa valmistajan verkkosivuilta sähköisessä muodossa. <<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/A645101EF4B241F59BF10DA3ACDC959C/Datacards%20or%20Manuals/manualE2620.pdf>>. Luettu 2.2.2014.

Nousiainen, Heidi 2012. Mitä uutta DNA:sta – Koko perimän laajuiset analyysimenetelmät ja niiden sovellukset. Koulutusmateriaali. Verkkodokumentti.
<http://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/Mita_uutta_DNAsta_Heidi_Nousiainen_SKKY_16112012.pdf>. Luettu 12.12.2013.

Orpana, Arto – Huoponen, Kirsi 2006. Geeni- ja kromosomimuutosten laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.) 2006: Perinnöllisyyslääketiede. 268–280. Helsinki: Duodecim.

Paunio, Tiina – Reima, Ilkka – Syvänen, Ann-Christine 1996. Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. Clinical Chemistry 42, No 9.

PGD eli alkiodiagnostiikka 2013. Verkkodokumentti.
<<http://www.vaestoliitto.fi/lapsettomuusklinikka/lapsettomuushoidot/hedelmoityshoidot/koeputkihedelmoitys-eli-ivf/alkiodiagnostiikka-eli-pgd/>>. Luettu 22.9.2013.

Pihlaja, Hannele 2006. Soluviljely. Opetukseen tarkoitettu kalvosarja. Metropolia AMK. Päivitetty 21.8.2006.

Pihlaja, Hannele 2014. Lehtori. Metropolia AMK. Helsinki. Suullinen tiedonanto 24.2.2014.

Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari – Haajanen, Kari 2012: Biogeeni. Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Tampere: Opetushallitus.

Qiagen Repli-g Midi Kit 2011. Ohjekirja. Ladattavissa valmistajan verkkosivuilta sähköisessä muodossa. <<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=843654e0-2ccb-474b-b4b8-8744453ed5cb&lang=en>>.

Qiagen Repli-g Midi Kit 2013. Tuotetiedot. Verkkodokumentti. <<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/repli-g-midi-kit#productdetails>>. Luettu 22.12.2013.

Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2012. Ohjekirja. Ladattavissa valmistajan verkkosivuilta sähköisessä muodossa. <<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=38faca1c-64b0-4281-aab3-aa8324bbd181&lang=en>>.

Qiagen Repli-g Single Cell Kit 2013. Tuotetiedot. Verkkodokumentti. <<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/repli-g-single-cell-kit#productdetails>>. Luettu 2.2.2013.

Qianli, Ma 2009. MDA mediated single cell genome sequencing. Creative commons search. File: Single cell sequencing (MDA).jpg. Verkkodokumentti. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Single_cell_sequencing_%EF%BC%88MDA%EF%BC%89.JPG>. Luettu 2.3.2014.

Qubit® 2.0 Fluorometer 2010. Catalog no. Q32866 User manual. Invitrogen by life technologies. Verkkodokumentti. <<http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell->

tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.0519.file.dat/qubit-2-fluorometer-user-manual.pdf>. Luettu 26.2.2014.

Qubit® vs NanoDrop 2014. Qubit® 2.0 Fluorometer vs. NanoDrop® Spectrophotometer. Verkkodokumentti. < <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/brands/product-brand/qubit/qubit-fluorometer-vs-nanodrop-nd-1000.html>>. Luettu 27.2.2014.

Ratia, Marja – Vuento, Risto – Laitinen, Kirsi 2010. Puhdistuksen, desinfektion ja steriloinnin tavoitteet ja tarve. Teoksessa Anttila, Veli-Pekka – Hellstén, Soile – Rantala, Arto – Routamaa, Marianne – Syrjälä, Hannu – Vuento, Risto (toim.) 2010: Hoitoon liittyvien infektioiden torjunta. 510–516. 6. painos. Porvoo: Suomen kuntaliitto.

Sha, K. – Boyer, L. A. 2009. The chromatin signature of pluripotent cells. Wikimedia commons. Creative commons search. File: The basic unit of chromatin organization is the nucleosome, which comprises 147 bp of DNA wrapped ar.jpg. Verkkodokumentti. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_basic_unit_of_chromatin_organization_is_the_nucleosome,_which_comprises_147_bp_of_DNA_wrapped_ar.jpg>. Luettu 28.2.2014.

Sojakka, Kirsi – Välimäki, Maija-Liisa 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Helsinki: Opetushallitus.

Solunetti 2006a. Aseptinen työskentely. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/aseptinen_tyoskentely/2/>. Luettu 1.2.2014.

Solunetti 2006b. Nukleonihappojen eristys ja puhdistus. Verkkodokumentti. < http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2/>. Luettu 27.2.2014.

Spencer, Martin 2011. Paired end reads of next generation sequencing data mapped to a reference genome. Creative commons search. File: Mapping Reads.png. Verkkodokumentti. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mapping_Reads.png>. Luettu 2.3.2014.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Julkaisun www-sivusto: <http://julkaisut.turkuamk.fi/geenitekniikka>. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Treff, Nathan – Fedick, Anastasia – Devkota, Batsal – Taylor, Deanne – Scott, Richard 2013. Evaluation of targeted next-generation sequencing -based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertility and Sterility*. Vol 99. April/2013.

Vanneste, Evelyne – Bittman, Lilach – Van de Aa, Niels – Voet, Thierry – Vermeesch, Jores Robert 2012. New array approaches to explore single cells genomes. *Frontier in genetics* 3. March 2012. Article 44. 1–6

Woyke, Tanja – Sczyrba, Alexander – Lee, Janey – Rinke, Christian – Tighe, Damon – Clingenpeel, Scott – Malmström, Rex – Stepanauskas, Ramunas – Cheng, Jan-Fang 2011. Decontamination of MDA Reagents for Single Cell Whole Genome Amplification. *PlosOne*. October, volume 6, issue 10.

Ygonaar 2006. PCR basic principle with component status versus temperature transition. Wikimedia commons. Creative commons search. File: PCR basic principle1.jpg. Verkkodokumentti.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_basic_principle1.jpg>. Luettu 2.3.2014.

Zheng, Ying-ming – Wang, Ning – Li, Lei – Jin, Fan 2011. Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *J Zhejiang Univ Sci B*. January; 12(1): 1–11.

Zymo Research. Genomic DNA Clean & Concentrator. Instruction manual 1.0.3. Verkkodokumentti. <<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/38/d4010i.pdf>>. Päivitysajankohta tuntematon. Luettu 27.2.2014.

Äikäs, Minna 2013. Opiskelijaesite. HUSLAB Genetiikan laboratorio. Innovaatioprojekti. Metropolia AMK 17.5.2013.

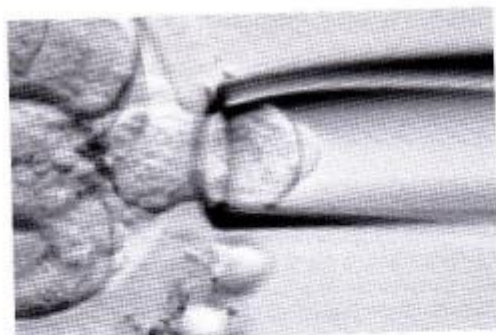
Koko genomin monistamisen tulokset – viljellyt solut

Testaus (1-5)	KITTI	NÄYTE	Solumäärä (laskenta burkerin kammiossa)	Solumäärä monistuksessa	Monistuksen tulos (pyöristetty desimaalit pois)
1.	Ei kittiä	186 lapsivesi	* 0-1 solua -> ei monisteta	Ei monistettu	Ei monistettu
2.	Repli-g Midi >600 solua (MDA)	163 iho	* n. 1650 solua/µl	* n. 600 solua * n. 1200 solua * n. 1800 solua	Mitattu jokainen näyte kahteen kertaan: * <u>600</u> : 2216/1690 ng/µl (ka 1953 ng/µl), 260/280: 1,65 * <u>1200</u> : 1767/1648 ng/µl (ka 1708 ng/µl), 260/280: 1,65 * <u>1800</u> : 1626/1655 ng/µl (ka 1640 ng/µl), 260/280: 1,65/1,66 * <u>kontrolli</u> : 1723/1746 ng/µl (ka 1734 ng/µl), 260/280: 1,66/1,67 Kaikkien keskiarvo: 1759 ng/µl, 260/280: 1,66 Puhdistettu 600 solun näyte, mitattu kahteen kertaan: * 552/415 ng/µl (ka 484 ng/µl), 260/280: 1,76/1,80 (ka 1,78)
3.	Repli-g Midi >600 solua (MDA)	106 istukka	* n. 1450 solua/µl	* n. 600 solua	Ennen puhdistusta: * <u>106</u> : 2147 ng/µl, 260/280: 1,65 * <u>122</u> : 2486 ng/µl, 260/280: 1,65 * <u>kontrolli</u> : 1996 ng/µl, 260/280: 1,68 Kaikkien keskiarvo: 2210 ng/µl, 260/280: 1,66
		122 istukka	* n. 270 solu/µl	* n. 800 solua	Puhdistuksen jälkeen: * <u>106</u> : 250 ng/µl, 260/280: 1,83 * <u>122</u> : 397 ng/µl, 260/280: 1,82 * <u>kontrolli</u> : 417 ng/µl, 260/280: 1,81 Kaikkien keskiarvo: 355 ng/µl, 1,82
4.	Repli-g Single Cell 1-1000 solua (MDA)	106	* n. 1450 solua/µl	* 106A: n. 7 solua * 106B: n. 14,5 solua * 106C: n. 21 solua	Ennen puhdistusta: * <u>106A</u> : 2147 ng/µl, 260/280: 1,74 * <u>106B</u> : 2172 ng/µl, 260/280: 1,74 * <u>106C</u> : 2134 ng/µl, 260/280: 1,73 * <u>122</u> : 2029 ng/µl, 260/280: 1,75 * <u>163</u> : 2010 ng/µl, 260/280: 1,73 * <u>kontrolli</u> : 1959 ng/µl, 260/280: 1,74 Kaikkien keskiarvo: 1749 ng/µl, 260/280: 1,74 Puhdistuksen jälkeen: * <u>106A</u> : 650 ng/µl, 260/280: 1,84 * <u>106B</u> : 287 ng/µl, 260/280: 1,84 * <u>106C</u> : 557 ng/µl, 260/280: 1,76 * <u>122</u> : 642 ng/µl, 260/280: 1,83 * <u>163</u> : 467 ng/µl, 260/280: 1,78 * <u>kontrolli</u> : 471 ng/µl, 260/280: 1,79 Kaikkien keskiarvo: 512 ng/µl, 260/280: 1,8
		122	* n. 270 solua/µl	* n. 27 solua	
		163	* n. 2700 solua/µl	* n. 27 solua	
5.	Single Cell WGA Kit 1-1000 solua (PCR)	106	* n. 1450 solua/µl	* n. 14,5 solua	Ennen puhdistusta: * 106: 858 ng/µl, 260/280: 1,73 * 122: 876 ng/µl, 260/280: 1,72 * 163: 952 ng/µl, 260/280: 1,72 Kaikkien keskiarvo: 895 ng/µl, 260/280: 1,72 Puhdistuksen jälkeen: * 106: 25 ng/µl , 260/280: 1,73 * 122: 27 ng/µl , 260/280: 1,69 * 163: 26 ng/µl , 260/280: 1,76 Kaikkien keskiarvo: 26 ng/µl, 260/280: 1,73
		122	* n. 270 solua/µl	* n. 27 solua	
		163	* n. 2700 solua/µl	* n. 27 solua	

Koko genomin monistamisen tulokset – alkio

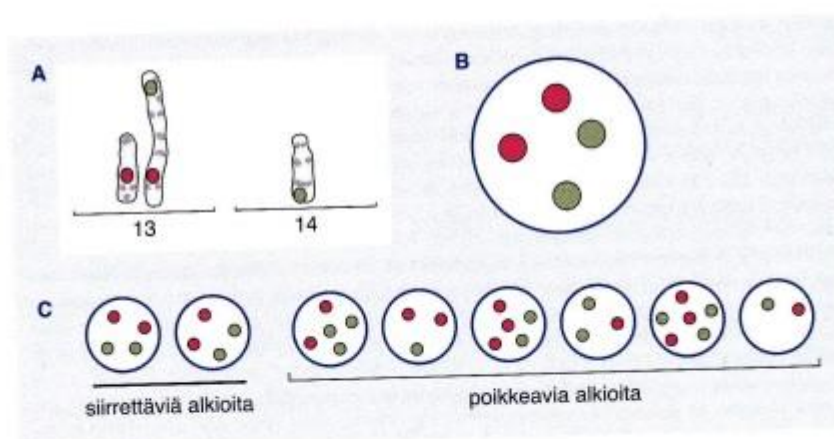
TESTAUS 1-4	KITTI	NÄYTE	Solumäärä	Monistuksen tulos Nanodropilla (pyöristetty desimaalit pois) (suluissa sinisellä Qubitilla saatu mittaustulos)
1.	Repli-g Single Cell 1-1000 solua (MDA)	1 (tuorenäyte)	~9	* 1: 2616 ng/μl , 260/280: 1,74 (108 ng/μl)
		2 (tuorenäyte)	~5	* 2: 2144 ng/μl , 260/280: 1,78 ("sample too high")
		5 (tuorenäyte)	~7-10	* 5: 3228 ng/μl , 260/280: 1,70 ("sample too high")
		Positiivinen kontrolli DNA (Repli-g oma kontrolli-DNA)		* Positiivinen kontrolli (DNA): 2059 ng/μl , 260/280: 1,74 ("sample too high") Kaikkien keskiarvo: 2512 ng/μl, 260/280: 1,74 <u>Puhdistuksen jälkeen:</u> * 1: 352 ng/μl , 260/280: 1,82 (106 ng/μl) * 2: 587 ng/μl , 260/280: 1,76 (120 ng/μl) * 5: 740 ng/μl , 260/280: 1,82 ("sample too high") * Positiivinen kontrolli (DNA): 487 ng/μl , 260/280: 1,78 ("sample too high")
2.	Single Cell WGA Kit 1-1000 solua (PCR)	3	~7-10	* 3: 883 ng/μl , 260/280: 1,74 (21,6 ng/μl)
		4	~3	* 4: 873 ng/μl , 260/280: 1,74 (46,6 ng/μl)
		6	>30	* 6: 833 ng/μl , 260/280: 1,74 (49,8 ng/μl)
				* 7: 925 ng/μl , 260/280: 1,74 (40 ng/μl)
				* 8: 896 ng/μl , 260/280: 1,74 (52,60 ng/μl)
				* Positiivinen kontrolli (DNA): 935 ng/μl , 260/280: 1,74
				* Negatiivinen kontrolli (vesi): 865 ng/μl , 260/280: 1,74
3.	Single Cell WGA Kit 1-1000 solua (PCR)	13	7-10 solua	* 13: 860 ng/μl , 260/280: 1,74
		14	3 solua	* 14: 930 ng/μl , 260/280: 1,75
		16	2 sola	* 16: 883 ng/μl , 260/280: 1,75
		Positiivinen kontrolli DNA (Repli-g kontrolli-DNA:sta laimennettu ohjeen mukaan Tris-HCL:ään)		* Positiivinen kontrolli (DNA): 878 ng/μl , 260/280: 1,74
				* Negatiivinen kontrolli (buffer): 912 ng/μl , 260/280: 1,74 (9,80 ng/μl)
				* Negatiivinen kontrolli (vesi): 909 ng/μl , 260/280: 1,74 (7,26 ng/μl)
				Kaikkien keskiarvo: 895 ng/μl, 260/280: 1,74
4.	Repli-g Single Cell 1-1000 solua (MDA)	9	1 solu	* 9: 2004 ng/μl , 260/280: 1,75 (91,2 ng/μl)
		11	~5 solua	* 11: 2914 ng/μl , 260/280: 1,73 (81,2 ng/μl)
		15	2 solua	* 15: 2111 ng/μl , 260/280: 1,74 (78,2 ng/μl)
		Positiivinen kontrolli DNA (Repli-g kontrolli-DNA:sta laimennettu ohjeen mukaan PBS:ään)		* Positiivinen kontrolli (DNA): 2750 ng/μl , 260/280: 1,72 (100 ng/μl)
				* Negatiivinen kontrolli (PBS): 2811 ng/μl , 260/280: 1,76 (80,4 ng/μl)
				* Negatiivinen kontrolli (vesi): 2652 ng/μl , 260/280: 1,73 (98,8 ng/μl)
				Kaikkien keskiarvo: 2540 ng/μl, 260/280: 1,74
		Negatiivinen kontrolli PBS (liuos, johon solut laimennetaan)		* Reaktiomix: 3114 ng/μl , 260/280: 1,80 (0,542 ng/μl)
				<u>Puhdistuksen jälkeen:</u>
				* 9: 554 ng/μl , 260/280: 1,76 ("sample too high")
				* Negatiivinen kontrolli (vesi): 253 ng/μl , 260/280: 1,82 (116 ng/μl)
		Negatiivinen kontrolli vesi (RNAasivapaa vesi)		* Reaktiomix: 4,59 ng/μl , 260/280: 1,49 (0,182 ng/μl)

Kopioston digilupa 1.3.2014



Kuva 14.7 Alklobiopsia.

tää myös invasiivista toimenpidet-
nasolujen keräämistä munasarjasta
toimalla emättimen kautta. Käsi-
tä johtuen alkiodiagnostiikkahoito
taan valmistelemaan huolellisesti
parin kohdalla. Terveellekin parille
tulee tehdä hedelmällisyyden
toitus. Harvinaisissa translokaatio-
dutaan usein varmistamaan FIS-
miin perustuvan diagnostiikan
nen vanhemman kromosomien



Kuva 14.8 Yleisimmän Robertsonin translokaation t(13q;14q) tutkiminen FISH-menetelmällä tilkkakierrossa. A) FISH-probit hybridisoituna metafaasikromosomeihin, B) Hybridisaatio normaalisolussa ja C) alkion soluihin tehty hybridisaatio. Vasemmalla alkiot, joita voidaan käyttää heidän balansoitumattomat alkiot.